

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2023, том 12, № 3

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь 2 декабря 2011 г.
Регистрационное свидетельство № 1496

Учредитель

УП «Профессиональные издания»
при участии Республиканского научного общества специалистов
клинической лабораторной диагностики Беларуси

Редакция:

Директор Л.А. Евтушенко

Заместитель главного редактора А.В. Жабинский

Руководитель службы рекламы и маркетинга М.А. Коваль

Технический редактор Д.В. Нужин

Адрес:

220049, ул. Кнорина, 17, Минск

Тел.: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78

e-mail: lab@recipe.by

Россия

Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
25 августа 2023 г.
Свидетельство ПИ № ФС77-85799

Учредитель и издатель

ООО «Вилин»

Редакция:

Директор Н.А. Рабкова

Адрес:

214522, Смоленская обл., Смоленский р-н, с.п. Катынское,

п. Авторемазод, д. 1А, пом. 413

e-mail: lab@recipe.by

Подписка

В каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):

индивидуальный индекс – 01389, ведомственный индекс – 013892

В электронных каталогах на сайтах агентств:

ООО «Прессинформ», ООО «Криэйтив Сервис Бэнд»,

ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

Электронная версия журнала доступна на сайтах lab.recipe.by,
recipe-russia.ru, в Научной электронной библиотеке elibrary.ru,
в базе данных East View, в электронной библиотечной
системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию

Журнал выходит один раз в три месяца.

Цена свободная

Подписано в печать: 12.09.2023

Дата выхода в свет: 22.09.2023

Формат 70x100^{1/16}. Печать офсетная

Тираж (Беларусь) 1000 экз.

Тираж (Россия) 5000 экз.

Заказ №

Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие «Типография
Федерации профсоюзов Беларуси».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготови-
теля, распространителя печатных изданий

№2/18 от 26.11.2013. Пл. Свободы, 23-103, г. Минск.

ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика. Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2023

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2023

© ООО «Вилин», 2023

Главный редактор

Камышников Владимир Семенович,
д.м.н., проф., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования (Минск, Беларусь)

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Анисько Л.А., к.м.н., Городская клиническая инфекционная больница (Минск, Беларусь)

Батуревич Л.В., к.м.н., доц., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Беляев С.А., Белорусское общество лабораторной медицины (Минск, Беларусь)

Вергун О.М., к.б.н., доц., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Владимирская Т.Э., к.б.н., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Гусина Н.Б., к.м.н., доц., Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (Минск, Беларусь)

Державец Л.А., д.б.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Долгов В.В., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Доценко Э.А., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Дубровский А.Ч., к.м.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Коломиец Н.Д., д.м.н., проф., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (Витебск, Беларусь)

Костюк С.А., д.м.н., проф., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Кочетов А.Г., д.м.н., Российский университет дружбы народов (Москва, Россия)

Кузьменко А.Т., к.м.н., доц., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Лелевич В.В., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)

Ляликов С.А., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)

Манаева Н.А., к.б.н., Белорусская медицинская академия последипломного образования (Минск, Беларусь)

Новикова И.А., д.м.н., проф., Гомельский государственный медицинский университет (Гомель, Беларусь)

Потапнев М.П., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Прохорова В.И., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Смолякова Р.М., д.б.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Таганович А.Д., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Рецензируемое издание

Журнал включен в базы данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, ПИНЦ.

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований. Решение коллегии ВАК от 24.10.2012 (протокол № 06-18/2).

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точку зрения автора.

Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2023 Volume 12 Number 3

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered

by the Ministry of information of the Republic of Belarus
on December 2, 2011.
Registration certificate No. 1496

Founder

UE "Professional Editions" with the participation of the Republican
scientific society of experts of the clinical laboratory diagnostics
of Belarus

Editorial office:

Director L. Evtushenko

Deputy editor-in-chief A. Zhabinski

Head of advertising and marketing department M. Koval

Technical editor D. Nuzhin

Address:

220049, Knorin str., 17, Minsk
Phones: (017) 322-16-77, 322-16-78
e-mail: lab@recipe.by

Russia

The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor)
on August 25, 2023.
Certificate ПИ No. ФС77-85799

Founder and Publisher

LLC "Vilin"

Editorial office:

Director N. Rabkova

Address:

214522, Smolensk region, Smolensk district,
rural settlement Katynskoye, Avtoremzavod village, 1A, office 413
e-mail: lab@recipe.by

Subscription

In the Republican unitary enterprise "Belposhta" (Belarus)
individual index – 01389, departmental index – 013892

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:

LLC "Pressinform", LLC "Kriektiv Servis Bend",
LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

The electronic version of the journal is available on lab.recipe.by,
recipe-russia.ru, on the Scientific electronic library elibrary.ru,
in the East View database, in the electronic library system IPRbooks

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office

The frequency of the journal is 1 time in 3 months.

The price is not fixed

Sent for the press: 12.09.2023

Release date: 22.09.2023

Format 70×100 1/16^o Litho

Circulation (Belarus) is 1000 copies

Circulation (Russia) is 5000 copies

Order No.

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics. Eastern Europe"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition is possible only with an obligatory reference to the source.

© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2023

© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2023

© LLC "Vilin", 2023

Editor-in-Chief

Vladimir S. Kamyshnikov,
Dr. of Med. Sci., Prof., Head of the Clinical Laboratory Diagnostics Department of the Belarusian Medical Academy
of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)

Editorial Board:

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Anisko L., Cand. of Med. Sci., City Clinical Infectious Diseases Hospital (Minsk, Belarus)
Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Beliaev S., Belarusian Society of Laboratory Medicine (Minsk, Belarus)
Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)
Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)
Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)
Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)
Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus)
Kochetov A., Dr. of Med. Sci., Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, Russia)
Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Vitebsk, Belarus)
Kostyuk S., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)
Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)
Manaeva N., Cand. of Biol. Sci., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)
Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof., Gomel State Medical University (Gomel, Belarus)
Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)
Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)
Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)
Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)
Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)
Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci., Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Minsk, Belarus)

Peer-Reviewed Edition

The journal is included in the databases Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, RSCI.

The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research. HCC board decision of 12.10.2012 (protocol No. 06-18/2).

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.

Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "On the Rights of Advertising" are advertisers.

Вниманию авторов и читателей!

В соответствии со сложившейся традицией очередной номер журнала «Лабораторная диагностика Восточная Европа» открывается статьями, посвященными вопросам организации деятельности клинической лабораторной службы. С учетом того, что одними из основополагающих принципов дальнейшего успешного развития лабораторной медицины являются стандартизация, автоматизация и информатизация, в данном номере журнала представлены статьи, отражающие достижения клиничко-лабораторной деятельности в указанных магистральных направлениях. Так, в первой из них научно обоснована не только значительно более высокая диагностическая эффективность использования методов жидкостной цитологии и цитоцентрифугирования по сравнению с традиционными технологиями исследования, но и достигаемая с их применением экономическая эффективность. Привлекает внимание то обстоятельство, что применение методов жидкостной цитологии и цитоцентрифугирования сопряжено со значительным снижением затрат (в 3,4 раза и в 6,5 раза соответственно) на единицу эффективности в сравнении с таковыми в случае использования метода традиционной цитометрии. На основании полученных данных, показавших высокую диагностическую информативность и экономическую эффективность применения методов жидкостной цитометрии и цитоцентрифугирования, авторами исследования предложено включать эти виды технологий в обязательный объем лабораторного исследования цитологического осадка мочи пациентов с подозрением на рак мочевого пузыря.

С учетом все более широкого внедрения лабораторных информационных систем в деятельность медицинских учреждений не может не обратить на себя внимание и большой опыт использования лабораторной информационной системы в деятельности Брестской областной больницы: ее широкое применение открыло новые возможности в повышении эффективности работы как самой (крупнейшей в Брестской области) централизованной клиничко-диагностической лаборатории, так и коллектива врачей разных клинических профилей.

Повышению эффективности деятельности клиничко-лабораторной службы, направленной на профилактику наследственно обусловленных заболеваний, способствует и сделанное авторами одной из статей предложение о целесообразности проведения скрининга новорожденных на предмет выявления врожденной иммунной недостаточности, что позволило бы предотвратить возникновение у них опасных для жизни инфекций, улучшило бы выживаемость и качество жизни.



Обращает на себя внимание и новый методологический подход к фенотипированию лимфоидных клеток слизистой оболочки кишки у пациентов с болезнью Крона. С использованием высокотехнологичных методов и предложенных алгоритмов лабораторного исследования авторами представленной статьи произведена оценка фенотипического состава лимфоидных клеток периферической крови и слизистой оболочки тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона, что позволило выявить такие изменения в основных и минорных популяциях мукозальных лимфоидных клеток врожденного и приобретенного иммунитета, которые предположительно вовлекаются в формирование аутоиммунного воспаления в тонкой и толстой кишке; их определение в периферической крови может являться диагностически значимым маркером рецидива заболевания.

Существенный вклад в область клинко-лабораторного исследования женщин, страдающих аномальными маточными кровотечениями, внесен и нашими коллегами из Ирака, которые в ходе осуществленного ретроспективного исследования биопсийного материала эндометрия не только показали диагностическую значимость оценки гистологических изменений эндометрия при аномальных маточных кровотечениях у женщин в возрасте от 16 до 70 лет, но и обосновали высокое качество и эффективность исследования образцов ткани эндометрия способом Pipelle.

Вниманием авторов помещенных в данном номере журнала статей охвачены высокотехнологичные лабораторные исследования при разных формах инфекционной (коронавирусной, туберкулезной, вызываемой грибами) и неинфекционной патологии, в том числе при заболеваниях системы крови (включая онкогематологические), женской половой сферы, органов пищеварения, мочевыделительной системы и др.

Все это соответствует принятой редакционной коллегией журнала концепции, предполагающей фокусировку внимания на реальной перспективе практического использования полученных в ходе осуществления клинко-лабораторных исследований новых научных результатов.

Надеемся, что статьи очередного номера нашего журнала будут востребованы как специалистами клинической лабораторной службы, так и врачами других специальностей в их научной и практической деятельности.

Главный редактор в Беларуси
Владимир Семенович Камышников



**Организация деятельности
клинико-лабораторной службы**
*Зайцева Л.П., Надыров Э.А.,
Лось Д.М., Малаева Е.Г.*
Стандартизация преаналитического
лабораторного этапа цитологического
исследования мочи, расчет
экономической эффективности 321

*Калина А.С., Матулис Г.И.,
Кабецкая И.В., Шахрай Ю.Л.*
Информатизация централизованной
клинико-диагностической лаборатории:
опыт внедрения лабораторно-
информационной системы
в Брестской областной клинической
больнице 330

**Заболевания системы крови /
Новые направления клинико-
лабораторных исследований**
*Полякова Е.А., Солнцева А.В.,
Белевцев М.В.*
Неонатальный скрининг
на первичные иммунодефициты:
обоснование, возможности
и перспективы 338

**Онкогематологические заболевания /
Молекулярно-генетические
исследования**
*Руденкова Т.В., Костюк С.А.,
Климкович Н.Н., Демиденко А.Н.,
Суворов Д.И.*
Распространенность полиморфизмов
в генах цитохрома P450 у пациентов
с острым лимфобластным и острым
миелобластным лейкозами 347

**Онкогематологические заболевания /
Клиническая микробиология**
Черновецкий М.А.
Лабораторная диагностика инвазивных
микозов и этиологическая структура
грибковой микрофлоры, выделенной
из клинически значимых видов
биологического материала
у детей с онкогематологической
патологией 358

**Заболевания органов пищеварения /
Высокотехнологичные лабораторные
исследования**
*Нижегородова Д.Б., Цеханович Д.А.,
Шулейко А.Ч., Старостин А.М.,
Ванслав М.И., Иванчик Г.И., Величко А.В.,
Зафранская М.М.*
Методологический подход к
фенотипированию лимфоидных клеток
слизистой оболочки кишки у пациентов
с болезнью Крона 371

*Дорошевич К.Н., Калинин А.Л., Михайлова Е.И.,
Трофимова Н.В., Сенникова А.В.,
Першенкова О.С., Мирге М.Н.*
Клинико-лабораторная характеристика
пациентов с циррозом печени:
ее зависимость от этиологии и класса
тяжести по Чайлду – Пью 385

**Коронавирусная инфекция
и ее осложнения /
Практикующему врачу**
*Гриневич Т.Н., Кот М.О., Бах М.С.,
Островская К.А.*
Клинико-лабораторные проявления
новой коронавирусной инфекции
COVID-19 у беременных в периоде
их госпитализации в лечебно-
профилактическое учреждение 396

**Акушерство и гинекология /
Гистопатологические исследования**
Альдиван М.А., Хамид О.Ф., Мактуф З.А.
Гистопатологическая оценка
биопсийного материала эндометрия
женщин пременопаузального
и постменопаузального возраста
с аномальными маточными
кровотечениями 409

*Хусейн Т.Х., Салман А.Х.,
Абд Оун Р.Д., Хамза Х.Дж.*
Сравнение качества взятия и
эффективности гистологического
исследования образцов ткани, полученных
с использованием пипетки (способом
Пиппеле) и методами классической
дилатации и кюретажа 415

Стоматология /**Молекулярно-генетические исследования***Полуян О.С., Костюк С.А.,**Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.*

Усовершенствование и клиническая апробация метода определения уровней нормализованной экспрессии генов костного гомеостаза (COL1A1) и рецептора витамина D (VDR) в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта424

Заболеемость туберкулезом / Превентивная лабораторная медицина*Будник О.А., Суркова Л.К., Иванова А.Л.,**Путрик Т.В., Кривошеева Ж.И.*

Оценка эффективности скрининга латентной туберкулезной инфекции с помощью теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона437

Нейроэндокринные расстройства / Лабораторный мониторинг*Кирячков Ю.Ю., Якубцевич Р.Э., Муслимов Б.Г.,**Лысенко И.Н., Данилец В.В.*

Многокомпонентный тест оценки эффективности дексмедетомидина как средства подавления симпатической гиперактивности при интенсивной терапии444

Заболеевания сердечно-сосудистой системы / Высокотехнологические лабораторные исследования*Лукша А.В., Максимович Н.А.,**Гуляй И.Э., Шулика В.Р.,**Глазев А.А., Клиса С.Д.,**Козич А.А.*

Методология оценки NO-синтазной активности эндотелия сосудов детей с артериальной гипертензией453

Нефрология /**Лабораторный мониторинг***Щастный А.Т., Осочук А.С.,**Марцинкевич А.Ф., Осочук С.С.*

Изменение состава нативных липопротеинов очень низкой плотности, содержания С-пептида и глюкозы крови у пациентов с терминальной почечной недостаточностью и в ранние сроки после пересадки почки с использованием такролимуса в качестве иммунодепрессанта460

Organization of Clinical Laboratory Service Work

Zaitsava L., Nadyrov E., Los D., Malaeva E.
Standardization of the Preanalytical Laboratory Stage of Urine Cytology, Calculation of Economic Efficiency 322

Anna S. Kalina, Galina I. Matulis, Inna V. Kabeckaya, Yuliya L. Shakhrai
Informatization of a Centralized Clinical Diagnostic Laboratory: Experience in Implementing a Laboratory-Information System in the Brest Regional Clinical Hospital 331

Diseases of the Blood System / New Directions of Clinical and Laboratory Research

Polyakova E., Solntsava A., Belevtsev M.
Neonatal Screening for Primary Immunodeficiency's: Rationale, Opportunities and Prospects 339

Oncohematological Diseases / Molecular and Genetic Studies

Tatiana V. Rudenkova, Svetlana A. Kostiuik, Natalia N. Klimkovich, Alla N. Demidenko, Dmitry I. Suvorov
The Prevalence of Polymorphisms in the Cytochrome P450 Genes in Patients with Acute Lymphoblastic and Acute Myeloid Leukemia 348

Oncohematological Diseases / Clinical Microbiology

Tchernovetski M.
Laboratory Diagnosis of Invasive Mycoses and the Etiological Structure of Fungal Microflora Isolated from Clinically Significant Types of Biological Material in Children with Oncohematological Pathology 360

Digestive Diseases / High-Tech Laboratory Research

Darya B. Nizheharodava, Dmitriy A. Tsekhanovich, Anatoliy Ch. Shuleika, Andrey M. Starastin, Marharyta I. Vanslau, Galina I. Ivanchyk, Alesia V. Vialichka, Marina M. Zafranskaya
Methodological Approach to the Mucosal Lymphoid Cells Phenotyping in Patients with Crohn's Disease 372

Kristina N. Doroshevich, Andrey L. Kalinin, Elena I. Mikhailova, Natalia V. Trofimova, Alina V. Sennikova, Volha S. Pershenkova, Marina N. Mirge
Clinical and Laboratory Characteristics of Patients with Liver Cirrhosis: Its Dependence on Etiology and Child – Pugh Severity Class 386

Coronavirus Infection and Its Complications / To the Practitioner

Tatiana N. Grinevich, Maksim O. Kot, Maria S. Bakh, Ksenia A. Ostrovskaya
Clinical and Laboratory Manifestations of the New Coronavirus Infection COVID-19 in Pregnant Women during Their Hospitalization in the Medical Institution 397

Obstetrics and Gynecology / Histopathological Studies

Aldeewan M.A., Hameed O.F., Maktoof Z.A.
Histopathological Evaluation of Biopsy Material of the Endometrium of Premenopausal and Postmenopausal Women with Abnormal Uterine Bleeding..... 408

Husain T.H., Salman A.H., Abd Oun R.D., Hamzah H.J.
Comparison of the Quality of Taking and the Efficiency of Histological Examination of Tissue Samples Obtained Using a Pipette (Pipelle) Method and Methods of Classical Dilation and Curettage 414

Dentistry /

Molecular and Genetic Studies

Poluyan O., Kostiuk S.,

Melnikova T., Yudina N.

Improvement and Clinical Testing of the Method for Determining the Normalized Expression Levels of Bone Homeostasis Gene (COL1A1) and Vitamin D Receptor Gene (VDR) in Biological Material of Patients with Inflammatory Periodontal Diseases 425

Tuberculosis Incidence /

Preventive Laboratory Medicine

Volha A. Budnik, Larisa K. Surkova,

Anastasia L. Ivanova, Tatsiana V. Putryk,

Zhanna I. Krivosheeva

Evaluation of the Effectiveness of Screening for Latent Tuberculosis Infection Using a Test Based on the Release of Interferon Gamma 438

Neuroendocrine Disorders /

Laboratory Monitoring

Yuri Y. Kiryachkov, Ruslan E. Yakubtsevich,

Bagautdin G. Muslimov, Inna N. Lysenko,

Violetta V. Danilets

A Multicomponent Test to Evaluate the Effectiveness of Dexmedetomidine as a Means of Suppressing Sympathetic Hyperactivity in Intensive Care 445

Diseases of the Cardiovascular System / High-Tech Laboratory Research

Aliaksandr V. Luksha,

Mikalai A. Maximovich, Irina E. Gulyai,

Valentina R. Shulika, Anton A. Glazev,

Sergey D. Klisa, Aliaksandr A. Kozich

Methodology for Assessing the NO-synthase Activity of the Vascular Endothelium in Children with Arterial Hypertension 454

Nephrology /

Laboratory Monitoring

Anatoly T. Shchastniy, Alexander S. Osochuk,

Alixander F. Martsinkevich, Sergey S. Osochuk

Changes in the Composition of Very Low Density Native Lipoproteins, C-Peptide and Blood Glucose Contents in Patients with Terminal Kidney Failure and Early After Kidney Transplant with the Use of Takrolimus as Immunosuppressant 461



<https://doi.org/10.34883/PL.2023.12.3.001>
УДК 612.461.1-076.5:31



Зайцева Л.П.¹✉, Надыров Э.А.², Лось Д.М.¹, Малаева Е.Г.²

¹ Гомельский областной клинический онкологический диспансер, Гомель, Беларусь

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Стандартизация преаналитического лабораторного этапа цитологического исследования мочи, расчет экономической эффективности

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – Зайцева Л.П.; редактирование, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации – Надыров Э.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Лось Д.М., Малаева Е.Г.

Благодарности: Сыч И.В. – главный экономист Гомельского областного клинического онкологического диспансера, Гомель, Беларусь; Ходор М.А. – экономист Гомельского областного клинического онкологического диспансера, Гомель, Беларусь.

Подана: 27.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: larysazaitsava2802@gmail.com

Резюме

Цель. Провести сравнительный анализ способов стандартизации преаналитического лабораторного этапа цитологического исследования клеточного осадка мочи с расчетом экономической эффективности применяемых методов.

Материалы и методы. Цитологические препараты осадка мочи были приготовлены с использованием методов жидкостной цитологии (ЖЦ), цитоцентрифугирования (ЦЦ) и простого центрифугирования (традиционного центрифугирования (ТЦ)). Было проанализировано 1930 образцов мочи пациентов с установленным диагнозом уротелиальной карциномы и подозрением на данную патологию. Для оценки экономической эффективности методов ЖЦ, ЦЦ (с применением оригинальных прокладок медленного поглощения и их аналогов) и ТЦ в исследовании клеточного осадка мочи был использован анализ эффективности затрат (cost effectiveness analysis).

Результаты. Метод ЖЦ значительно повышал диагностическую чувствительность (ДЧ) (92,54%), специфичность (ДС) (94,21%) и диагностическую точность (ДТ) цитологического исследования (94,45%). Метод ЦЦ с применением цитоцентрифуги Aerospray с циторотором Cytopro повышал ДЧ (87,87%) и ДС (94,21%), показатель ДТ составил 96,92%. Метод ТЦ показал самые низкие показатели ДЧ, ДС и ДТ, которые составили 42,28%, 91,53% и 44,51% соответственно. Проведенный сравнительный анализ экономической эффективности изучаемых методов по соотношению финансовых средств и затрат трудового времени показал значительные преимущества методов ЖЦ и ЦЦ. При использовании метода ЖЦ производится в 3,4 раза меньше затрат на единицу эффективности, а при использовании ЦЦ с применением аналогов прокладок медленного поглощения – в 6,5 раза в сравнении с методом ТЦ.

Выводы. Проведенный сравнительный анализ экономической эффективности использования методов ТЦ, ЖЦ и ЦЦ в исследовании клеточного осадка мочи по соотношению затрат трудового времени и финансовых средств показал значительные

преимущества метода ЖЦ и ЦЦ. Учитывая диагностическую ценность и экономическую эффективность методов ЖЦ и ЦЦ, целесообразно включать их в обязательный объем исследования первичных пациентов с подозрением на рак мочевого пузыря.

Ключевые слова: цитологическая диагностика, клеточный осадок мочи, жидкостная цитология, цитоцентрифугирование, диагностическая эффективность, экономическая эффективность

Zaitsava L.¹✉, Nadyrov E.², Los D.¹, Malaeva E.²

¹ Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Belarus

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Standardization of the Preanalytical Laboratory Stage of Urine Cytology, Calculation of Economic Efficiency

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research conception and design, material collection, processing, text writing – Zaitsava L.; editing, critical content check, manuscript approval for publication – Nadyrov E.; research conception and design, editing – Los D., Malaeva E.

Acknowledgements: Sych I. – chief economist of the Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Belarus; Khodor M. – economist of the Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Belarus.

Submitted: 27.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: larysazaitsava2802@gmail.com

Abstract

Purpose. A comparative analysis of methods of standardization of the preanalytical laboratory stage of cytological examination of urine cellular sludge with calculation of economic efficiency of the methods used.

Materials and methods. Urine sediment preparations were prepared by liquid cytology (LC), cyto centrifugation (CC) and simple centrifugation (conventional centrifugation – CC). We analyzed 1.930 urine samples from patients diagnosed with urothelial carcinoma and suspected of this pathology. A cost-effectiveness analysis was used to assess the cost-effectiveness of the LC, CC (using the original slow absorption pads and their counterparts) and TC methods in the study of urine cellular sludge.

Results. The LC method significantly increased the diagnostic sensitivity (92.54%), specificity (94.21%), and diagnostic accuracy of cytological examination (94.45%). The CC method using an Aerospray cyto centrifuge with a cytorotor Cytopro increased diagnostic sensitivity (87.87%) and specificity (94.21%), and the diagnostic accuracy rate was 96.92%. The TC method showed the lowest values of diagnostic sensitivity, specificity and diagnostic accuracy, which were 42.28%, 91.53% and 44.51%, respectively. A comparative analysis of the economic efficiency of the studied methods in terms of the ratio of financial resources and labor time showed significant advantages of the LC and CC methods. When using the LC method, 3.4 times less costs per unit of efficiency are incurred, and when using CC with the use of analogues of slow absorption pads – 6.5 times in comparison with the TC method.

Conclusions. A comparative cost-effectiveness analysis of the TC, LC and CC methods in the study of urine cellular sludge in terms of the ratio of labor time and financial resources



showed significant advantages of the LC and CC methods. Given the diagnostic value and cost-effectiveness of the LC and CC methods, it is advisable to include them in the mandatory scope of investigation of primary patients with suspected urinary bladder cancer.

Keywords: cytological diagnosis, urine cell sludge, liquid cytology, cytocentrifugation, traditional cytology, diagnostic efficiency, cost-effectiveness

■ ВВЕДЕНИЕ

По данным Белорусского канцер-регистра, в структуре онкологической заболеваемости населения Беларуси рак мочевого пузыря (РМП) составляет 2,5%. За 2020 г. в республике зарегистрирован 1071 случай впервые выявленного РМП [1]. Цитологическое исследование клеточного осадка мочи включено в алгоритм диагностики и лечения злокачественных новообразований и применяется в качестве дополнительного метода исследования при первичном обследовании и как основной метод при наблюдении за пациентами, страдающими РМП [2].

Стандартизация преаналитического лабораторного этапа цитологического исследования осадка мочи является одним из основных компонентов на пути к достоверному цитологическому заключению. И в зависимости от ресурсов лаборатории цитологические препараты осадка мочи могут быть приготовлены различными технологиями концентрирования клеток: методами ЖЦ, ЦЦ и ТЦ [3]. Многие цитологические лаборатории и цитологические отделы клинико-диагностических лабораторий в Беларуси зачастую оснащены только центрифугами типа ОПН-8, ЦЛМН-Р10-01 «Элекон», применение которых значительно снижает ДЧ (42,4%), ДС (93,6%) и ДТ (44,6%) цитологического исследования осадка мочи [4].

В целях стандартизации преаналитического лабораторного этапа цитологического исследования целесообразно внедрять в работу лабораторий современное автоматизированное оборудование для концентрирования клеточных элементов на предметном стекле с учетом экономической эффективности применяемых методов. К таковым относятся оборудование (процессоры, установки, окрашивающие станции) для приготовления цитологических препаратов биологических жидкостей методом ЖЦ, цитоцентрифуги для метода ЦЦ. В настоящее время данное оборудование имеет высокую стоимость, что затрудняет внедрение изучаемых методов в работу лабораторий.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сравнительный анализ способов стандартизации преаналитического лабораторного этапа цитологического исследования клеточного осадка мочи с расчетом экономической эффективности применяемых методов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом анализа являлось цитологическое исследование клеточного осадка мочи в качестве медицинской диагностической услуги при оценке патологии мочевого пузыря. В централизованной цитологической лаборатории (ЦЦЛ) учреждения

«Гомельский областной клинический онкологический диспансер» (У «ГОКОД») приготовление цитологических препаратов биологических жидкостей осуществляется методами ЖЦ, ЦЦ и ТЦ.

Приготовление цитологических препаратов клеточного осадка мочи методом ЖЦ включает следующие этапы: простое центрифугирование свежего образца мочи; помещение полученного осадка мочи в виалу Cellprep, содержащую консервирующий раствор; с помощью процессора Cellprep Plus формирование монослоя клеток; фиксация приготовленного препарата в этаноле с последующей окраской по Папаниколау в автоматизированной станции Myreva SS-30H [5].

Из виалы можно приготовить несколько препаратов – препарат для цитологического исследования и, если необходима дальнейшая дифференциальная диагностика найденных патологических изменений, препарат для иммуноцитохимического исследования (ИЦХ).

При этом осадок в цитологических препаратах, приготовленных методом ЖЦ, размещается на предметном стекле в диагностическом «окошке» диаметром 20 мм; оптимизируется фон (слизь, элементы воспаления, клеточный детрит лизируются специализированными растворами); клетки и комплексы клеток располагаются в виде монослоя, что позволяет получить четкую морфологическую картину и определить характер изменений ядра клетки.

Так, использование метода ЖЦ с применением автоматизированной системы приготовления цитологического препарата Cellprep Plus позволяет значительно повысить ДЧ (92,54%), ДС (94,21%) и ДТ (94,45%) цитологического исследования в диагностике патологии мочевого пузыря за счет получения стандартизованных монослойных препаратов [3].

В марте 2022 г. в лаборатории была установлена цитоцентрифуга Aerospray с циторотором Cytopro и применением системы автоматической окраски клинических образцов. Цитоцентрифуга и функции окраски в ней – два независимых процесса. Для приготовления цитологического препарата клеточного осадка мочи методом цитоцентрифугирования отбирают 100–300 мкл образца (предварительное центрифугирование традиционным способом проводится или не проводится в зависимости от клеточности материала). В дальнейшем образец помещают в многоразовые камеры с абсорбирующими прокладками. Циторотор Cytopro снижает потери клеток во время концентрирования и предотвращает случайное повреждение собранного образца, который распределяется в диагностическом «окошке» диаметром 8 мм. Препараты окрашивают стандартизованно в цитоцентрифуге Aerospray по Романовскому – Гимзе с уменьшенным расходом красителей при смене циторотора Cytopro на ротор для окрашивания [6].

Следует отметить, что в состав комплектующих к цитоцентрифуге входят прокладки медленного поглощения Cytopro, производителем которых является компания ELITechGroup Inc., США. Указанные расходные материалы являются дорогостоящими и на данный момент приобретение их затруднено. Нами было предложено использовать бумагу фильтровальную лабораторную производства Российской Федерации (РФ) в качестве прокладок медленного поглощения.

Благодаря замещению дорогостоящих оригинальных прокладок медленного поглощения Cytopro фильтровальной бумагой производства РФ мы удешевили стоимость расходных материалов (с 3,09 руб. до 0,0009 руб. на одно исследование)



и при отсутствии ресурсов закупки расходных материалов получили возможность продолжать использовать в ежедневной работе лаборатории новое оборудование. Данное предложение (с расчетом экономической эффективности) было признано рационализаторским и принято УО «Гомельский государственный медицинский университет» к использованию под наименованием «Аналог прокладки медленного поглощения для цитоцентрифуги Aerospray с циторотором Cytopro». Получено удостоверение № 1356 23.05.2022 г.

Традиционный способ концентрирования клеток (центрифугирование с применением центрифуги Fenox MC-24) и распределения осадка на предметные стекла имеет ряд существенных недостатков, состоящих в следующем:

- при удалении надосадочной жидкости невозможно стандартизовать остаточный объем жидкости для распределения на стекла;
- материал (осадок) наносится на 4–10 (в среднем 7) предметных стекол и при наличии густого осадка, добиваясь распределения клеток более тонким слоем, количество стекол для просмотра увеличивается;
- при нанесении осадка на стекло возможно повреждение клеток с нарушением целостности клеточных структур;
- загрязнение фона исследуемого препарата воспалительными элементами, эритроцитами, слизью, бактериями.

Несмотря на существенные преимущества методов ЖЦ и ЦЦ, приготовление цитологических препаратов осадка мочи с использованием ТЦ до сих пор применяется в большинстве цитологических лабораторий Беларуси.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с февраля 2022 г. по декабрь 2022 г. в ЦЦЛ было проанализировано 452 образца мочи, которые были приготовлены методом ЦЦ. В качестве «золотого стандарта» для определения диагностической эффективности методов цитологического исследования был использован результат гистологического исследования. Установлено, что метод ЦЦ с применением цитоцентрифуги Aerospray с циторотором Cytopro повышает ДЧ (87,87%), ДС (94,21%) теста диагностики РМП с использованием цитологического исследования за счет снижения потери клеток во время концентрирования и предотвращения случайного повреждения собранного образца. Также было установлено, что использование метода ЦЦ увеличивает показатель ДТ цитологического исследования клеточного осадка мочи и позволяет получить заключения, которые в 96,92% случаев совпадают с результатами гистологического исследования; вместе с тем при использовании метода ЖЦ совпадение составило 94,45%, а ТЦ всего – 44,51%.

Для оценки экономической эффективности методов ЖЦ, ЦЦ и ТЦ в исследовании клеточного осадка мочи нами был использован анализ эффективности затрат (затраты/эффективность), который позволил учесть и соотнести как расходы, так и эффективность диагностических тестов [7, 8].

Анализ «затраты – эффективность» (cost effectiveness analysis – CEA) – тип клинико-экономического анализа, при котором проводят сравнительную оценку результатов и затрат при двух и более методах диагностики и лечения, эффективность которых различна, а результаты измеряются в одних и тех же единицах [8–10]. Согласно данному методу расчет проводят по формуле:

$$CEA = (DC + IC) / Ef,$$

где CEA – соотношение «стоимость/эффективность»;

DC – прямые затраты (direct costs);

IC – непрямые затраты (indirect costs);

Ef – эффективность диагностического теста (effectiveness).

Важно отметить, что в расчет стоимости цитологического исследования клеточного осадка мочи, приготовленного методами ЖЦ и ЦЦ, включено по одному предметному стеклу (исследуемый материал концентрируется на одном стекле в достаточном количестве для получения достоверного цитологического заключения), в то время как при традиционном методе исследования материал распределяется на предметных стеклах в количестве от 4 до 10, в среднем 7 стекол.

Сравнительная оценка методов ЖЦ, ЦЦ и ТЦ в исследовании клеточного осадка мочи показала, что наряду с неодинаковой эффективностью применяемых в лаборатории методов определяются и различия в экономических затратах (табл. 1).

Расчет себестоимости диагностических тестов проводился без учета стоимости расходных материалов, поскольку тарифы на платные медицинские услуги устанавливаются без учета стоимости применяемых материалов, оплачиваемых заказчиком дополнительно [11].

Из табл. 1 следует, что себестоимость исследования клеточного осадка мочи методом ЖЦ составила 13,06 руб., методом ЦЦ – 15,08 руб., в то время как себестоимость исследования методом ТЦ – 40,03 руб. (в ценах на период январь 2023 г.).

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ экономической эффективности применяемых методов цитологического исследования осадка мочи (табл. 2).

Таблица 1
Экономические затраты, себестоимость диагностического теста
Table 1
Economic costs, the cost of diagnostic test

Метод концентрирования клеточных элементов мочи	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.	Отчисления в Фонд соц. защиты населения, руб.	Страховой взнос по обязатель. страхованию от несчастных случаев, руб.	Профессиональное пенсионное страхование, руб.	Накладные расходы, руб.	Амортизация медицинского оборудования, руб.	Себестоимость услуги, руб.
Исследование клеточного осадка мочи методом ЖЦ (1 стекло)	4,880	0,399	1,795	0,005	0,317	4,929	0,737	13,06
Исследование клеточного осадка мочи методом ЦЦ (1 стекло)	5,195	0,424	1,910	0,005	0,337	5,247	1,961	15,08
Исследование клеточного осадка мочи ТЦ (7 стекол)	15,834	1,294	5,823	0,015	1,028	15,992	0,045	40,03



Таблица 2

Затраты и эффективность исследований клеточного осадка мочи методами ЖЦ и ТЦ

Table 2

Costs and effectiveness of urine cell sludge studies by LC and TC methods

Метод концентрирования клеточных элементов мочи	Стоимость услуги (прямые и непрямые затраты), руб.	Стоимость материалов (прямые затраты), руб.	Итого затрат, руб.	Эффективность метода, %
Исследование клеточного осадка мочи методом ЖЦ (1 стекло)	13,06	18,40	31,46	94,45
Исследование клеточного осадка мочи методом ЦЦ с использованием оригинальной прокладки медленного поглощения Cytopro (1 стекло)	15,08	5,56	20,64	96,92
Исследование клеточного осадка мочи методом ЦЦ с использованием аналога прокладки медленного поглощения Cytopro (1 стекло)	15,08	1,71	16,79	96,92
Исследование клеточного осадка мочи ТЦ (7 стекол)	40,03	10,01	50,04	44,51

По данным, представленным в табл. 2, видно, что более дорогим по стоимости оказалось цитологическое исследование, выполненное простым центрифугированием. Этот показатель оказался на 37,1% выше, чем у метода ЖЦ, на 58,7% выше, чем у метода ЦЦ с применением оригинальных прокладок медленного поглощения, и на 66,4% выше, чем у метода ЦЦ с использованием аналогов прокладок, предложенных для использования авторами данного исследования.

Таким образом, коэффициент СЕА при использовании метода ЖЦ составил 0,333 руб. на единицу эффективности ($CEA=31,46/94,45=0,333$); при ЦЦ с применением оригинальных прокладок – 0,213 руб. на единицу эффективности ($CEA=20,64/96,92=0,213$); при ЦЦ с применением аналогов прокладок – 0,173 руб. на единицу эффективности ($CEA=16,79/96,92=0,173$), а при традиционном методе – 1,124 руб. на единицу эффективности ($CEA=50,04/44,51=1,124$).

Ввиду того, что соотношение «затраты – эффективность» при цитологическом исследовании клеточного осадка мочи методом ЖЦ оказалось в 3,4 раза ниже ($1,124/0,333$), чем при цитологическом исследовании, выполненном методом ТЦ (то есть производятся меньшие затраты на единицу эффективности), то применение метода ЖЦ более экономично, а соответственно, предпочтительнее [12].

Также очевидно, что использование метода ЦЦ с применением аналогов прокладок медленного поглощения оказалось более экономично по сравнению с методом ЖЦ – в 1,9 раза ($0,333/0,173$), а по сравнению с простым центрифугированием – в 6,5 раза ($1,124/0,173$).

Экономическая эффективность цитологического исследования осадка мочи методами ЖЦ и ЦЦ объясняется меньшими временными затратами специалистов, участвующих в выполнении данного исследования. Нормы времени специалистов, участвующих в цитологических исследованиях осадка мочи, представлены в табл. 3 [13].

Таблица 3
Нормы времени (минуты) специалистов, выполняющих цитологическое исследование клеточного осадка мочи
Table 3
Time standards (minutes) for specialists performing cytological examination of urine cellular sediment

Метод концентрирования клеточных элементов мочи	Исследование цитологического препарата врачом клинической лабораторной диагностики, мин.	Приготовление цитологического препарата фельдшером-лаборантом, мин.
Исследование клеточного осадка мочи методом ЖЦ (1 стекло)	20	8,5
Исследование клеточного осадка мочи методом ЦЦ (1 стекло)	18	17
Исследование клеточного осадка мочи ТЦ (7 стекол)	70	42

Из табл. 3 видно, что время, затрачиваемое на преаналитический лабораторный и аналитический этапы одного цитологического препарата, приготовленного методами ЖЦ и ЦЦ, значительно ниже норм времени сопоставляемого метода ТЦ. Однако фельдшер-лаборант на приготовление препарата методом ЦЦ тратит на 50% времени больше, чем при приготовлении препарата методом ЖЦ. Это связано с перестановкой роторов и предметных стекол в цитоцентрифуге Aerospray.

■ ВЫВОДЫ

1. Метод ЖЦ с применением автоматизированной системы приготовления цитологического препарата Cellprep Plus значительно повышает диагностическую чувствительность (92,54%), специфичность (94,21%) и диагностическую точность (94,45%) цитологического исследования в диагностике патологии мочевого пузыря за счет получения стандартизованных монослойных препаратов. В то же время показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста исследования с использованием традиционной центрифуги составляют лишь 42,28%, 91,53% и 44,51% соответственно.
2. Метод ЦЦ с применением цитоцентрифуги Aerospray с циторотором Cytopro повышает ДЧ (87,87%) и ДС (94,21%) цитологического исследования мочи в диагностике мочевого пузыря, а также увеличивает показатель диагностической точности до 96,92%; вместе с тем при использовании метода жидкостной цитологии диагностическая точность исследования составляет 94,45%, тогда как при использовании традиционного центрифугирования – 44,51%.
3. Проведенный сравнительный анализ экономической эффективности методов ЖЦ, ЦЦ (с применением оригинальных прокладок медленного поглощения и их аналогов) и ТЦ по соотношению финансовых средств и затрат трудового времени показал значительные преимущества методов ЖЦ и ЦЦ. При использовании метода ЖЦ производится в 3,4 раза меньше затрат на единицу эффективности, а при использовании ЦЦ с применением аналогов прокладок – в 6,5 раза.
4. Учитывая диагностическую ценность и экономическую эффективность методов ЖЦ и ЦЦ (с использованием аналогов прокладок медленного поглощения) в исследовании клеточного осадка мочи, считаем необходимым включить их



в алгоритм диагностики рака мочевого пузыря – в обязательный объем исследования первичных пациентов с подозрением на данную патологию.

5. Принимая во внимание низкую диагностическую точность и экономическую эффективность метода простого центрифугирования, считаем целесообразным не использовать его как самостоятельный метод концентрирования клеток для цитологического исследования клеточного осадка мочи, а применять в качестве подготовительного этапа для методов ЖЦ и ЦЦ.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Okeanov A.E. et al. *Cancer in Belarus: figures and facts. Analysis of data from the Belarusian Cancer Registry for 2011–2020*. Minsk: Professional Editions, 2022;302 p. (In Russian)
2. Algorithms of diagnosis and treatment of malignant diseases. *Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus of July 06, 2018;60:539*. (In Russian)
3. Savostikova M.V., Kudaibergenova A.G., Fedoseeva E.S., et al. Draft recommendations on cytomorphological diagnosis of urinary tract pathology. *Oncopathology*. 2019;2:52–67. DOI: 10.17650/2618-7019-2019-2-1-2-52-67. (In Russian)
4. Zaitsava L.P., Los D.M., Nadirov E.A. et al. Liquid technology in the cytological diagnosis of urinary bladder pathology. *Problems of Health and Ecology*. 2021;18(4):61–68. (In Russian)
5. Cellprep PLUS LBC System user manual. www.biodyne.asia
6. Aerospray Hematology Pro user manual. www.elitechgroup.com
7. Zaitsava L.P., Los D.M., Nadirov E.A. Cost-effectiveness of the method of liquid cytology in the study of cellular sediment of urine. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, 2022;11(4). (In Russian)
8. Nazarov F.N., Akhmedov A., Gulmuradov T.G. Clinical and economic analysis of the effectiveness of traditional and laparoscopic methods of treatment of acute appendicitis. *Endoscopic surgery*. 2014;20(4):24–27. (In Russian)
9. Adzhienko V.L., Zhivotova S.V., Legenkova N.M. Estimation of the economic efficiency of medical technologies in the treatment and preventive care institution. *Drug Bulletin*. 2012;6(46):7–11. (In Russian)
10. Valik O.V., Sakovich V.A., Ponomarenko G.S. Cost-effectiveness of diagnostic magnetic resonance imaging service in the federal center of cardiovascular surgery. *Siberian Medical Review*. 2013;1:86–90. (In Russian)
11. On regulation of tariffs for paid medical services. *Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus*. February 3, 2015;14:5. (In Russian)
12. Zaitseva L.P., Los D.M., Nadirov E.A. Cost-effectiveness of the liquid cytology method in the study of urine cellular sludge. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, 2022;11(4). (In Russian)
13. On the establishment of time and material consumption rates for paid medical services for laboratory diagnostics, provided by legal entities regardless of their form of ownership and subordination and individual entrepreneurs. *Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus* May 10, 2017;34:684. (In Russian)



Калина А.С.✉, Матулис Г.И., Кабецкая И.В., Шахрай Ю.Л.
Брестская областная клиническая больница, Брест, Беларусь

Информатизация централизованной клиничко-диагностической лаборатории: опыт внедрения лабораторно-информационной системы в Брестской областной клинической больнице

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Калина А.С. – концепция, дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста; Матулис Г.И. – дизайн исследования, написание текста, литературный обзор; Кабецкая И.В. – написание текста, редактирование; Шахрай Ю.Л. – дизайн исследования, сбор материала.

Подана: 31.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: doctanna@yandex.ru

Резюме

Глобализация, повсеместное развитие информационных систем и их интеграция во все сферы экономики требуют широкомасштабных изменений, в том числе и в области медицины. С попытками автоматизировать и облегчить рабочий процесс медицинского персонала возникает потребность в использовании специализированных информационных систем. В статье представлена информация об особенностях апробированной лабораторной информационной системы и предоставляемых ею широких возможностях совершенствования деятельности клиничко-диагностических лабораторий, а также отражен опыт автоматизации крупнейшей в Брестской области централизованной клиничко-диагностической лаборатории учреждения здравоохранения «Брестская областная клиническая больница», связанный с использованием лабораторно-информационной системы. Уделено внимание тем задачам, которые ставились перед разработчиками системы, а также принципам и критериям выбора информационной системы с учетом открываемых ею новых возможностей деятельности лаборатории после внедрения в медицинскую практику, а также возможностям, которые приобрела лаборатория после внедрения.

Ключевые слова: автоматизация, лабораторная информационная система, ЛИС, веб-сервис, интеграция, здравоохранение, штрихкодирование, валидация, информационная система, информационные технологии



Anna S. Kalina✉, Galina I. Matulis, Inna V. Kabeckaya, Yuliya L. Shakhrai
Brest Regional Clinical Hospital, Brest, Belarus

Informatization of a Centralized Clinical Diagnostic Laboratory: Experience in Implementing a Laboratory-Information System in the Brest Regional Clinical Hospital

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Anna S. Kalina – concept, research design, material collection, processing, text writing; Galina I. Matulis – research design, text writing, literature review; Inna V. Kabeckaya – text writing, editing; Yuliya L. Shakhrai – research design, material collection.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: doctanna@yandex.ru

Abstract

Globalization, the widespread development of information systems and their integration in all areas of the economy require large-scale changes, including in the medical field. With attempts to automate and facilitate workflow for medical personnel, it is necessary to use specialized information systems. This article will consider the capabilities and features of the laboratory information system, as well as the experience of automating the largest centralized clinical diagnostic laboratory in the Brest region – Brest Regional Clinical Hospital using the laboratory information system. Also, attention is paid to the tasks that were set for the developers, the principles and criteria for choosing an information system, as well as the opportunities that the laboratory acquired after implementation.

Keywords: automation, laboratory information system, LIS, web service, integration, healthcare, bar coding, validation, information system, information technology

■ ПРЕДПОСЫЛКИ И ЦЕЛИ ВНЕДРЕНИЯ ЛИС

Сфера здравоохранения является одной из областей разработки и внедрения передовых технологий цифровизации, все более широкое использование которых составляет одно из важнейших направлений развития государства. В связи с переходом к информационному обществу и внедрению информационных систем почти в каждую сферу деятельности возросла необходимость автоматизации многих этапов рабочего процесса, в том числе осуществляемого медицинским персоналом. Заполнение медицинских документов вручную, процессы маркировки пробирок, обработка возрастающего объема информации о диагностических исследованиях претерпевают все более значительные изменения.

Рабочие процессы учреждений здравоохранения автоматизировались при помощи специально разработанных медицинских информационных систем (МИС), а применительно к клинико-диагностическим лабораториям – лабораторных информационных систем (ЛИС). Лабораторные информационные системы становятся

все более распространенным и незаменимым инструментом автоматизированного управления лабораторией.

К настоящему времени именно клинико-диагностическая лаборатория превращается в одно из самых высокотехнологичных отделений медицинского учреждения. Стоит отметить, что актуальность ЛИС также связана с тем, что через клинико-диагностическую лабораторию многопрофильного стационара (в частности, Брестской областной клинической больницы) проходит более 5000 образцов биологического материала в сутки. Такой рабочий процесс, безусловно, требует его автоматизации и грамотной координации [1, 2].

Учреждение здравоохранения «Брестская областная клиническая больница» является ведущим лечебным учреждением Брестской области. Коечный фонд стационара составляет 992 койки, в том числе 42 реанимационные.

Отделение клинической лабораторной диагностики Брестской областной клинической больницы – крупный многопрофильный центр клинической лабораторной диагностики, в котором выполняется около 2,7 миллиона исследований в год. Задачами отделения являются своевременное и высококачественное выполнение лабораторных исследований. Ежедневно в отделение клинической лабораторной диагностики поступает более 2000 образцов биологического материала пациентов Брестской областной клинической больницы, других учреждений здравоохранения города и области.

Отделение клинической лабораторной диагностики оснащено современным высокотехнологичным диагностическим оборудованием ведущих мировых производителей: Sysmex, Beckman Coulter, Siemens, Instrumentation Laboratory и др. В штате отделения клинической лабораторной диагностики 60 сотрудников.

■ КРИТЕРИИ ВЫБОРА ЛАБОРАТОРНОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ

Чтобы повысить качество и скорость получения результатов лабораторных исследований, необходимо было осуществить внедрение системы информационной автоматизации, так как при существующей инструментальной автоматизации сложно контролировать и прослеживать каждый этап процессов, протекающих в лаборатории. В больнице была установлена только медицинская информационная система (МИС), к которой был необходим лабораторный сегмент.

На этапе выбора лабораторной информационной системы следовало решить непростую задачу – полное соответствие ее требованиям персонала лаборатории, таким как:

- максимальная автоматизация лабораторного процесса: требовалось располагать не просто базой данных, в которую приходят результаты исследования с анализаторов, а полноценной системой для удобной работы с согласованностью всех процессов – от получения заказа до выдачи результата;
- работа со штрихкодами: поскольку лаборатория оборудована новейшими высокопроизводительными анализаторами, возможности которых по использованию доступного им широкого спектра лабораторных исследований используются далеко не полностью, открываются возможности внедрения в практику новых лабораторных тестов; к тому же это обеспечивает создание новых, пересмотр имеющихся программ адаптации к наборам реагентов и многое другое;



- интеграция лабораторной информационной системы с МИС;
- повышение скорости выполнения исследований и получение результатов лечащим врачом в кратчайшие сроки;
- встроенная система контроля качества, позволяющая анализировать данные с разных анализаторов на одном экране ЛИС в режиме реального времени;
- значительная автоматизация постаналитического этапа (подготовка и выдача результатов, выдача дубликата, рассылка результатов на почту, подготовка отчетов, аналитика);
- создание возможности для удаленного заказа направлений и просмотров результатов (для врачей и сторонних заказчиков из Брестской области).

Помимо этого, требовалось достичь высокого качества и оперативности оказания технической поддержки производителями ЛИС, а также планомерного развития и постоянного расширения возможностей ЛИС в каждой обновленной версии системы. В результате тщательно осуществленного анализа этапов проведения процедур закупок победителем стала современная полнофункциональная ЛИС «DiasensLab», Республика Беларусь.

■ ПРОЦЕСС ВНЕДРЕНИЯ ЛИС

Внедрение ЛИС в отделении клинической лабораторной диагностики Брестской областной клинической больницы происходило в несколько этапов. На первом из них сотрудники компании-разработчика осуществили визит для оценки всего масштаба работы, были подготовлены схемы лабораторий, кабинетов с расстановкой рабочих мест и имеющегося оборудования, оговорены вопросы полной перестройки лабораторного процесса после внедрения системы.

На втором этапе происходило создание всей номенклатуры исследований Брестской областной клинической больницы. Данный этап был одним из наиболее значимых, поскольку от полноты, достоверности и своевременности предоставления разработчику информации зависела успешность всего процесса внедрения.

На третьем этапе проходило внедрение лабораторной информационной системы в отделении клинической лабораторной диагностики Брестской областной клинической больницы. Проект был реализован в кратчайшие сроки (3 недели) без прерывания рабочего процесса лаборатории. Нельзя не отметить, что внедрение ЛИС составило весьма трудоемкий как со стороны разработчика системы, так и со стороны заказчика процесс; обязательным условием успешной реализации проекта явились активное участие и заинтересованность коллектива лабораторий во внедрении лабораторной информационной системы.

■ АВТОМАТИЗАЦИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИИ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ

Для информатизации централизованной клинико-диагностической лаборатории особенно ценным представлялось использование следующих функций внедренной в лабораторно-диагностическую практику системы:

1. Работа со штрихкодами: отпала необходимость ручного ввода информации о пробе в анализаторы, так как каждый из подключенных приборов начал получать всю информацию о пациенте и назначении из ЛИС.

2. Автоматизация выполнения «ручных» и ИФА-методов исследования с помощью рабочих списков. Автоматизированы были такие процессы, как постановка СОЭ по Панченкову, внесение результатов электрофореграмм, постановка ПЦР-анализов и др. Работа с рабочими списками действительно упростила процесс исследования, а также сократила время внесения данных в систему.
3. Автовалидация методов исследований в соответствии с заранее настроенными алгоритмами (рис. 1). Настройка автовалидации производилась спустя полгода после первичного внедрения системы. Оказалось важным идти по пути еще большего упрощения работы и автоматизации процессов и совместно с сотрудниками компании разработчиков настроить правила автовалидации для всех видов биохимического и коагулологического исследований. Внедрение автоодобрения позволило сконцентрировать внимание врачей на «патологических» пробах и ускорить время выдачи результатов.
4. Создан внутрिलाбораторный модуль контроля качества, объединивший все анализаторы. Модуль контроля качества позволяет вести установочные серии непосредственно в ЛИС с возможностью прослеживания всех статистически значимых показателей, таких как CV, CVi, SD, bias, Xcp и т. д. (рис. 2). Большинство анализаторов поставляют результаты контроля качества автоматически после постановки, однако система реализует также возможность ручного внесения результатов контроля качества для анализаторов, не подключенных к ЛИС, что очень удобно, так как все данные можно просмотреть в одной вкладке.
5. Веб-кабинеты, благодаря которым партнеры лаборатории и сторонние заказчики имеют возможность самостоятельно регистрировать направления и скачивать результаты, а также следить за ходом выполнения исследований в режиме онлайн.
6. Гибкий конструктор отчетов, который позволяет за короткое время собрать необходимую статистическую информацию и подготовить отчеты любой степени сложности с наглядными диаграммами (рис. 3).
7. Удобство сортировки проб различными способами. Предусмотрена возможность сортировки по цвету и типу пробирок, а также сортировки по заявке (рис. 4).
8. Возможность отследить историю заявок (время регистрации, время поступления в лабораторию, время выдачи результата), а также не поступивший в лабораторию биоматериал.
9. Настройка разнообразных правил и формул (например, правило автоматического назначения мазка при неудовлетворительных результатах ОАК, расчет СКФ, расчет показателей суточного объема мочи исходя из диуреза и т. д.), а также выделение различными цветами проб в соответствии с этими правилами для упрощения работы сотрудников лаборатории (рис. 5).
10. Удобный и интуитивно понятный интерфейс позволил освоить современную информационную систему всем сотрудникам, вне зависимости от их уровня компьютерной подготовки.
11. Возможность рассылки результатов на почту, а также современные и информативные бланки результатов, которые настраивались под запросы лаборатории.
12. Постановка электронно-цифровой подписи сотрудника, выполнившего исследование.



Название теста	Результат	Нормы	Ед. и...	Замеча...	Пред.рез.	Delta %	Delta	Причина, препятствующ...	Критич.	Автодообр.
Билирубин общий	✓ 12,3	6,6 - 28,2	мкм...		8,8	-39,77%	-3,5		Нет	Да
Билирубин прямой	✗ 5,2	1,3 - 5,7	мкм...		1,6	-225,00%	-3,6	Не пройден Delta Check	Нет	Нет
Глюкоза	✓ 6,2	4,1 - 6,1	ммоль...	повы...	5,9	-5,08%	-0,3		Нет	Да
Калий	✗ 6,40	3,50 - 5,50	ммоль...	повы...	4,70	-36,17%	-1,70	Не пройден Delta Check	Нет	Нет
Креатинин	⚠ 649,4	72,0 - 127,0	мкмоль...	повы...	151,8	-327,80%	-497,6	Критический результат	⚠ Выявлен	Нет
Мочевина	⚠ 43,5	3,11 - 7,84	ммоль...	повы...	9,9	-339,39%	-33,6	Критический результат	⚠ Выявлен	Нет
Натрий	✓ 139	136 - 156	ммоль...		146	4,79%	7		Нет	Да
Общий белок	✓ 67,40	66,00 - 81,00	г/л		72,90	7,54%	5,50		Нет	Да

Рис. 1. Автовалидация биохимических исследований
Fig. 1. Autovalidation of biochemical analyses

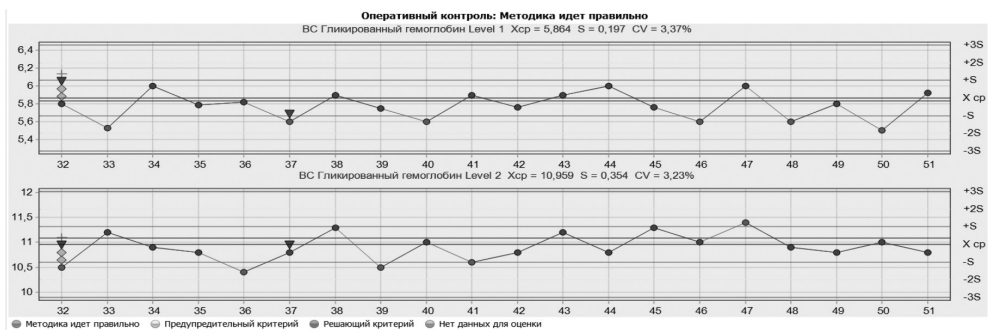


Рис. 2. Графики Леви – Дженнинга в ЛИС «DiasensLab»
Fig. 2. Levy – Jennings plots in LIS "DiasensLab"

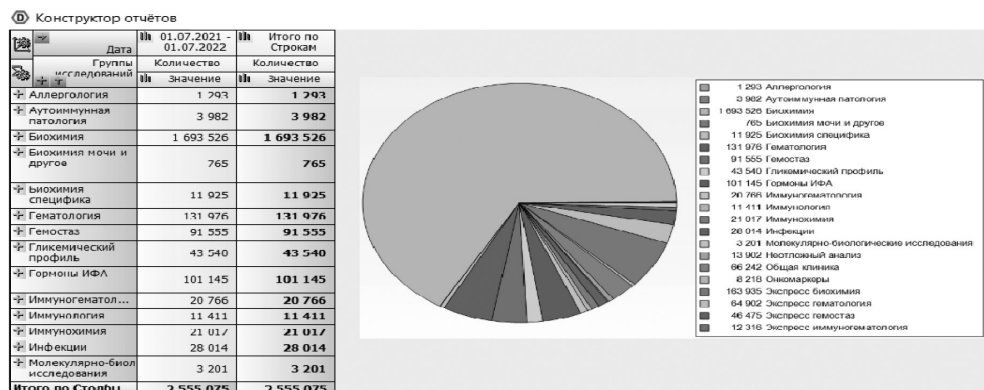


Рис. 3. Отчет, построенный с помощью конструктора отчетов
Fig. 3. A report which was created using Report Designer

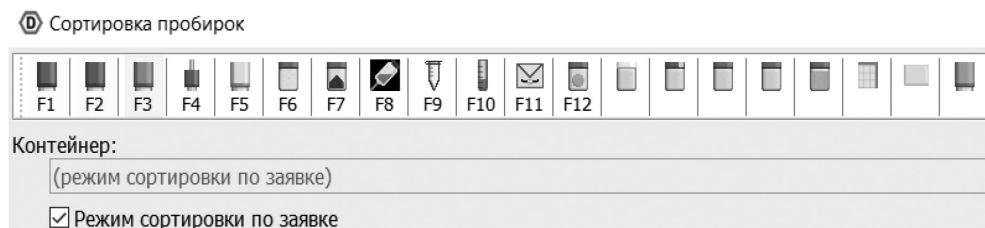


Рис. 4. Сортировка пробирок с разным типом биоматериалов
Fig. 4. Sorting of tubes with different types of biomaterial

№ Пробы	Дата регис...	Дата актив...	Выполнена	Е...	Биоматериал	ФИО Пациента	Д/р	П...	История	Статус	Заказчик	Отделение заказчика
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ АЛЕКСАНДР ...	29.08...	М	Есть	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ ОЛЕГ АЛЕКС...	29.12...	М	Косве...	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ НИКОЛАЙ АН...	10.07...	М	Есть	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ГНОЙНОЙ ХИР...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВАЯ ВАЛЕНТИНА Г...	13.07...	Ж	Нет	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ТОРАКАЛЬНО...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ НИКОЛАЙ КО...	07.10...	М	Нет	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ГНОЙНОЙ ХИР...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ ИГОРЬ ВАСИ...	23.01...	М	Есть	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ГНОЙНОЙ ХИР...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ КИРИЛЛ АЛЕ...	27.02...	М	Косве...	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВАЯ ТАМАРА ВИТА...	30.04...	Ж	Нет	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ГНОЙНОЙ ХИР...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВАЯ ГЕЛЕНА РОМУ...	13.12...	Ж	Косве...	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ГНОЙНОЙ ХИР...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВАЯ АННА НИКОЛ...	23.10...	Ж	Нет	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ТОРАКАЛЬНО...
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВАЯ АНТОНИНА Н...	14.02...	Ж	Косве...	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ОЖОГОВОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
900000...	02.08.22 1...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ ИЛЬЯ КОНСТ...	16.10...	М	Косве...	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ ВИКТОР ГРИГ...	20.10...	М	Нет	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ЧЕЛЮСТНО-Л...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ СЕРГЕЙ НИК...	06.10...	М	Есть	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ АНЕСТЕЗИОЛ...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ ВАДИМ ГЕНН...	22.07...	М	Нет	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ОТДЕЛЕНИЕ ЧЕЛЮСТНО-Л...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ СЕРГЕЙ ГРИГ...	04.06...	М	Косве...	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ МИРОН ИВАН...	14.10...	М	Косве...	Закр...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...
900000...	02.08.22 2...	03.08.22 0...	03.08.22...	●	Моча ...	ТЕСТОВЫЙ КОНСТАНТИ...	21.05...	М	Есть	Отк...	МЦ "Медицинский цен...	ИНФЕКЦИОННОЕ ОТДЕЛЕН...

Рис. 5. Выделение цветом проб с атипичными клетками (синим) и проб, в которых необходимо проверить белок и глюкозу (оранжевым)
Fig. 5. Highlighting samples with abnormal cells (blue) and samples that need to be tested for protein and glucose (orange)

■ РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕДРЕНИЯ

В результате внедрения информационной системы «DiasensLab» стало намного проще управлять лабораторией, контролировать и прослеживать каждый этап процессов, протекающих в лаборатории, контролировать действия сотрудников и планировать всю текущую работу. Опыт использования этой системы, накопленный в течение полутора лет работы с ней, позволил прийти к следующему заключению:

- сократилось время получения результатов лечащим врачом. Например, при выполнении биохимического анализа крови ранее требовалась многоэтапная ручная регистрация – кодировка пробирки, внесение информации в базу анализатора, внесение результатов исследований в журнал, а затем в медицинскую систему. В среднем результат исследования к врачу поступал обычно к 16:00 часам (для сторонних заказчиков – через 2–3 суток). На сегодняшний день результат биохимического исследования врачу-клиницисту доступен в истории болезни через 2,5–3 часа после поступления биологического материала в лабораторию;



- благодаря внедрению ЛИС пересмотрены подходы к работе с учетом понимания правильного функционирования информационной системы. С июня 2022 г. в Брестской областной клинической больнице стартовал проект по замене устаревшей МИС на новую систему. Интеграция лабораторной информационной системы с МИС позволила вносить результаты лабораторных исследований в истории болезни, выписные эпикризы, что значительно экономит время на оформление документации у врачей отделений;
- организована эффективная прозрачная система внутреннего контроля качества, позволяющая анализировать данные с разных анализаторов на одном экране ЛИС в режиме реального времени;
- практически сведено к нулю количество ошибок из-за человеческого фактора при регистрации лабораторных исследований на постаналитическом этапе. В отсутствие информатизации ручная регистрация данных являлась источником серьезных ошибок, особенно в том случае, когда было необходимо вручную вводить в медицинскую систему большое количество чисел и результатов;
- внедрение ЛИС привело к экономическому эффекту в виде экономии финансовых ресурсов больницы за счет оптимизации штатного расписания лаборатории в сторону значительного сокращения ставок специалистов;
- в распоряжении заведующего лабораторией появилась легкая и прозрачная система управления персоналом: каждый сотрудник заходит в ЛИС под своим персональным логином и паролем, и все его действия фиксируются в режиме реального времени.

Внедрение современной ЛИС в повседневную практику позволило интегрировать между собой лабораторное оборудование в единое лабораторное информационное пространство, что практически полностью минимизировало вероятность возникновения ошибок при выполнении лабораторных исследований, повысило скорость выполнения анализа через все этапы лабораторного процесса. Интеграция лабораторного оборудования подобного рода является решением одной из медицинских задач, которая направлена на повышение качества оказания лабораторных услуг и повышение индекса производительности лаборатории [3].

Главным итогом внедрения является то, что сотрудники лаборатории более не занимаются рутинными процессами, которые автоматизировала ЛИС, а занимаются непосредственно клинической и аналитической работой.

Таким образом, ЛИС – это уникальный инструмент автоматизации, позволяющий выйти на совершенно новый качественный уровень работы клинико-диагностической лаборатории.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Degtyareva A.V. Features of automation of work in the laboratory using a laboratory information system (LIS). *International student scientific journal*. 2017. (in Russian)
2. Lyalyakina E.V. LIS in KDL – a necessity or an unaffordable luxury? *Directory of the head of the CDL*. 2018;6. (in Russian)
3. Zolotarev P.N. Laboratory information systems as an independent class of complex software systems in laboratory medicine. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ"*. 2016;1. (in Russian)



Полякова Е.А.✉, Солнцева А.В., Белевцев М.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Неонатальный скрининг на первичные иммунодефициты: обоснование, возможности и перспективы

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: обзор литературы – Полякова Е.А.; концепция и дизайн исследования – Солнцева А.В.; редактирование – Белевцев М.В.

Подана: 29.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: polyakovakat86@gmail.com

Резюме

Основной целью неонатального скрининга новорожденных является раннее выявление бессимптомных младенцев с рядом тяжелых заболеваний, для которых доступно эффективное лечение и для которых ранняя диагностика и вмешательство предотвратят серьезные последствия. Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность является врожденным нарушением иммунной функции, которая требует быстрой диагностики и лечения для предотвращения опасных для жизни инфекций, улучшения выживаемости и качества жизни. Отсутствие функциональных Т- и/или В-лимфоцитов при врожденных нарушениях иммунитета служит диагностическим критерием, который используют для скрининга новорожденных. К настоящему времени существует метод ранней диагностики, основанный на определении продуктов рекомбинации генов рецепторов Т- и В-лимфоцитов, который эффективен для выявления первичных иммунодефицитов. В настоящее время, по данным регистра первичных иммунодефицитов Республики Беларусь, зарегистрировано 22 пациента с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью, из них пяти пациентам выполнена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. 4/5 пациентов после трансплантации живы. Таким образом, частота встречаемости данной патологии составляет приблизительно 1 на 300 000, в сравнении с мировыми данными это свидетельствует о недооцениваемости тяжелой комбинированной иммунной недостаточности в связи с ранней младенческой смертностью. Для полномасштабного внедрения скрининга необходимо проведение пилотного исследования с установлением частоты встречаемости не более чем 1 на 50 000 новорожденных. В статье проведен анализ исследований, отражающих данные как о пилотных проектах, так и о полномасштабном неонатальном скрининге первичных иммунодефицитов в разных странах.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, ТКИН, неонатальный скрининг, TREC, KREC



Polyakova E.✉, Solntsava A., Belevtsev M.

Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Neonatal Screening for Primary Immunodeficiency's: Rationale, Opportunities and Prospects

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: literature review – Polyakova E.; study concept and design – Solntsava A.; editing – Belevtsev M.

Submitted: 29.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: polyakovakat86@gmail.com

Abstract

The main purpose of neonatal newborn screening is the early detection of asymptomatic infants with a number of severe diseases for which effective treatment is available and where early diagnosis and intervention prevent serious consequences. Severe combined immune deficiency is a congenital disorder of immune function that requires rapid diagnosis and treatment to prevent life-threatening infections, improve survival and quality of life. The absence of functional T- and/or B-lymphocytes of congenital immune disorders serves as a diagnostic criterion and can be used for screening newborns. There is a reliable and sensitive method for quantifying markers of T- and B-lymphocyte angiogenesis, which has proven effective in screening studies to identify primary immunodeficiency in the countries where they are conducted. To date, there is an early diagnostic method based on the determination of recombination products of T- and B-lymphocyte receptor genes, which is effective for detecting primary immunodeficiencies. Currently, according to the register of primary immunodeficiencies of the Republic of Belarus, 22 patients with severe combined immunodeficiency are registered, of which five patients underwent hematopoietic stem cell transplantation. Currently, 4/5 transplant patients are alive. Thus, the incidence of this pathology is approximately 1 in 300,000, in comparison with world data, this indicates the underdetection of SCID due to early infant mortality. And for the full implementation of screening, it is necessary to conduct a pilot study with the establishment of a frequency of occurrence of no more than 1 in 50,000 newborns. The article analyzes studies that reflect data from both pilot projects and full-scale neonatal screening for primary immunodeficiency's in different countries.

Keywords: primary immunodeficiencies, SCID, neonatal screening, TREC, KREC

■ ВВЕДЕНИЕ

Первичные иммунодефициты (ПИД) представляют собой гетерогенную группу врожденных нарушений иммунитета, приводящих к смертности детей с данным заболеванием в раннем возрасте [1, 2]. На сегодняшний день описано 485 генетических поломок, приводящих к ПИД [3]. Наиболее опасным, тяжелым, угрожающим жизни ребенка заболеванием является тяжелая комбинированная иммунная

недостаточность (ТКИН), которая проявляется недостатком Т-лимфоцитов. В-лимфоциты и НК-клетки могут отсутствовать в разной степени в зависимости от молекулярного дефекта [4, 5]. Как правило, дети с ТКИН рождаются здоровыми, т. е. без клинических признаков заболевания, однако уже к 2–3 месяцам жизни заболевание проявляется тяжелыми инфекциями, вплоть до генерализованных форм, порой с атипичным характером. Без ранней диагностики, а значит, своевременного лечения заболевание фатально и дети погибают на первом году жизни.

Распространенность и заболеваемость ПИД варьируются в зависимости от типа заболевания, возраста, пола, этнической принадлежности и географического положения.

Ранее считалось, что ПИД встречаются редко, а частота ТКИН была неизвестна. С тех пор перспективные программы скрининга позволили определить истинную заболеваемость ТКИН и для каждой страны она разная. Кроме того, скрининг способствовал выявлению и лечению младенцев, которые в противном случае умерли бы от осложнений невыявленного ТКИН. На основании исследований, проведенных в США, в ходе которых было обследовано более 3 миллионов младенцев, частота ТКИН оказалась намного выше, чем ожидалось, и составила 1/58 000, а частота клинически значимой Т-клеточной лимфопении составила 1/7300 [6]. Учитывая, что ПИД представляют собой большую и гетерогенную группу генетических заболеваний, которые по отдельности являются редкими состояниями, скрининг новорожденных предлагает дополнительные преимущества в ранней диагностике данной патологии.

■ ИСТОРИЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ НА ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

ТКИН представляет собой значимую социальную и медицинскую проблему в связи с ранней младенческой смертностью. Очевидна привлекательность возможности своевременного лечения, снижения и предотвращения детской смертности с помощью раннего выявления. основополагающей характеристикой любого скрининга является снижение смертности от той или иной патологии. По этой причине ТКИН является подходящим «кандидатом» для скрининга новорожденных согласно критериям Уилсона и Юнгера, которые включают: невозможность выявления заболевания рутинными методами, используемыми неонатологами и педиатрами при рождении ребенка; значительное негативное влияние заболевания на здоровье новорожденного ребенка; возможность излечения либо значительного улучшения качества жизни пациента при ранней постановке диагноза; существование простого, недорогого, эффективного и специфического лабораторного анализа для скрининга искомого заболевания [7]. Ввиду того, что ТКИН проявляется низким уровнем или отсутствием Т-лимфоцитов, скрининг новорожденных на Т-клеточную лимфопению является идеальной стратегией для выявления заболевания.

В 1970-х гг. были предприняты первоначальные попытки скрининга новорожденных на ТКИН с дефицитом аденозиндезаминазы (АДА) с использованием колориметрического анализа фермента АДА в «сухой капле» крови, но они не увенчались успехом из-за пропущенных случаев и большого количества ложноположительных результатов [8]. Интерлейкин-7 (ИЛ-7), продуцируемый стромальными клетками тимуса для индукции пролиферации и дифференцировки незрелых тимоцитов, также был предложен в качестве биомаркера ТКИН. Однако ввиду низкой стабильности



и быстрой деградации ИЛ-7 в «сухой капле» крови было получено много ложноположительных результатов, поэтому и этот тест не выдержал проверки временем [9].

Следующая предложенная стратегия включала скрининг каждого новорожденного с полным анализом крови для определения количества лимфоцитов, который считался недостаточно чувствительным [10]. Впоследствии также рассматривался скрининг пуповинной крови на популяции Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Однако, учитывая, что это, вероятно, потребует много времени и экономически невыгодно, продолжался поиск других методов, которые были бы эффективны для выявления Т-клеточной лимфопении [11].

В 1982 г. методом электронной микроскопии была обнаружена внехромосомная кольцевая ДНК в тимоцитах мыши. Благодаря процессу клонирования было установлено, что данная ДНК в виде кольца – не что иное, как продукт запрограммированной перестройки гена Т-клеточного рецептора. Данные экцизионные кольца получили название TREC (с англ. T-cell receptor excision circle) [12].

Метод по определению TREC был разработан Douek et al. Первоначально TREC использовались для мониторинга образования новых Т-клеток у ВИЧ-инфицированных лиц, получающих эффективное антиретровирусное лечение. По результатам исследований было продемонстрировано, что TREC были специфичны для наивных Т-лимфоцитов и ранних тимических мигрантов, описано снижение TREC с возрастом, что связано с физиологическим процессом – инволюцией тимуса – и при ВИЧ-инфекции. Исследователями было отмечено, что TREC стабильны, не склонны к деградации и не реплицируются при последующем клеточном делении, что делает их идеальным маркером для продукции наивных Т-лимфоцитов [13].

Основополагающая статья была опубликована С. Chan и J. Puck в 2005 г., описывающая возможность и эффективность определения TREC для обнаружения ТКИН в условиях скрининга новорожденных [14].

В 2007 г. был открыт маркер неогенеза В-лимфоцитов – KREC, который образуется в результате рекомбинации генов тяжелой цепи иммуноглобулина каппа при формировании В-клеточного рецептора. Группа ученых во главе с van Zelm et al. исследовали возможность использования KREC (с англ. kappa-deleting recombination excision circle) на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) у пациентов с нарушением лимфопоэза В-лимфоцитов [15]. Они продемонстрировали и доказали, что уровни KREC отсутствуют или могут быть снижены при X-сцепленной агаммаглобулинемии и общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН) [16, 17].

Впоследствии метод определения TREC и KREC был оптимизирован и лег в основу первого пилотного исследования по выявлению ТКИН, начатого в 2008 г. в штате Висконсин (США). В результате был выявлен новорожденный с ТКИН, которому впоследствии была выполнена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [18]. После того, как в 2005 г. было продемонстрировано, что количественная оценка TREC в образцах «сухой капли» является эффективным средством скрининга на выявление ТКИН, этот метод был официально рекомендован в США в 2010 г. В настоящее время скрининг новорожденных применяется во всех штатах США. Пилотные исследования, а также скрининг проводятся во многих странах Европы и Ближнего Востока. В некоторых странах в скрининговых исследованиях применяется только определение TREC, в некоторых – комбинированный анализ, а именно определение и TREC, и KREC (см. таблицу).

Скрининг новорожденных на ПИД с определением как TREC, так и KREC дает преимущества по сравнению с одним только скринингом TREC. Это включает выявление пациентов с дефицитом В-лимфоцитов, к примеру, с X-сцепленной агаммаглобулинемией [19, 20]. Одновременное определение TREC/KREC также облегчает диагностику синдрома Неймегена (NBS), атаксии-телеангиоэктазии и других форм ПИД, которые в противном случае могут быть пропущены [21, 22]. Комбинированный скрининг помогает в диагностическом процессе и позволяет проводить целенаправленную молекулярную диагностику, поскольку различные мутации при ПИД приводят к вариабельной картине дефицита Т- и В-лимфоцитов.

Помимо Т- и В-клеточной лимфопении TREC и/или KREC могут быть снижены при таких состояниях, как трисомия 21-й хромосомы, синдром CHARGE, недоношенность, аутоиммунные заболевания матери при беременности, прием иммуносупрессивных препаратов также может сопровождаться Т-лимфопенией с низким уровнем TREC. Врожденный лейкоз также является причиной низкого уровня Т-клеток. Ограничением метода определения TREC и/или KREC является невозможность выявить

Методы и результаты проведения скрининга новорожденных на ПИД
Methods and results of newborn screening for PID

Страна	Метод скрининга	Дата начала	Установленная частота встречаемости ТКИН	Источники
США (50 штатов) Народность Навахо	TREC	2018. ГПС	1:58 000 1:2000 (ген Artemis)	Dorsey & Puck, 2017 [23] http://www.info4pi.org/
Флоренция (Италия)	TREC/ADA	2013. ПИ	1:18 981	Study http://ipopi.org/
Тайвань	TREC	2010. ПИ 2012. ГПС	1:131 000	Chien Y.H. et al., 2017 [24]
Израиль	TREC	2011. ПИ 2015. ГПС	1:22,374	Rechavi et al., 2017 [25]
Нидерланды	TREC	2012. ПИ 2021. ГПС	1:141 343	Blom et al., 2017 [26]
Саудовская Аравия	TREC	2018. ГПС	1:2906	Mousa et al., 2018 [27]
Германия	TREC/KREC	2013. ПИ 2017. ГПС	1:22 143	http://ipopi.org/
Швеция	TREC/KREC	2013. ПИ 2020. ГПС	1:38 500	Göngrich et al., 2021 [28]
Япония	TREC/KREC	2014. ПИ 2017. ГПС	1:68 742	Wakamatsu et al., 2021 [29]
Франция	TREC	2017. ПИ	1:95 259	Audrain et al., 2021 [30]
Испания (Каталония)	TREC/KREC	2017. ГПС	1:74 187	Argudo-Ramírez et al., 2021 [31]
Великобритания	TREC	2021. ПИ	1 43 600	http://ipopi.org/
Австрия	TREC/KREC	2017. ПИ	Неизвестно	http://ipopi.org/
Швейцария	TREC/KREC	2019. ГПС	Неизвестно	http://ipopi.org/
Российская Федерация	TREC/KREC	2021. ПИ 2023. ГПС	1:14 000	https://amgevents.signifco.ru/videodec22#rec438057929

Примечания: ГПС – государственная программа скрининга; ПИ – пилотное исследование.



такие ТКИН, как дефицит АДА с генетической поломкой в гене ADA, дефицит Zap70; дефицит МНС II класса [32].

Известные в мире тест-системы направлены как на определение только TREC, так и на определение и TREC и KREC [33–36]. Но все же одновременное определение обоих маркеров является эффективным с точки зрения единовременного определения дефицита как T, так и В-клеточного звена в одном исследовании.

В Республике Беларусь на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (РНПЦ ДОГИ) с 2016 г. был разработан собственный метод количественного определения TREC и KREC в результате выполнения тем НИР: № госрегистрации 20180839. Задача 6.11 «Разработать метод определения кольцевых продуктов реаранжировки генов T- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени для диагностики иммунопатологических состояний» (2016–2020) [37]. Метод представляет собой одновременное определение уровней TREC и KREC в цельной периферической крови, в «сухой капле» крови с высокой диагностической эффективностью, чувствительностью и специфичностью и с 2020 г. используется в клинико-диагностическом процессе по выявлению ПИД. Исследование может быть проведено без зарубежных, а только с отечественными реагентами [38, 39].

Скрининг новорожденных на ПИД во всем мире продолжает оставаться развивающейся областью, направленной на раннюю диагностику тяжелых нарушений иммунной системы, для которых очень важно своевременное лечение.

■ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СКРИНИНГА НА ПИД

Помимо очевидных клинических преимуществ неонатальный скрининг должен быть экономически выгодным и эффективным. Экономическая эффективность и целесообразность неонатального скрининга ТКИН рассчитаны в ряде исследований на основании частоты встречаемости, чувствительности, специфичности скринингового теста, а также его стоимости, которая составляет около 10 долл. США [40, 41]. Для определения экономической эффективности скрининга были также рассчитаны показатели общей выживаемости при проведении ТГСК в период до 3,5 месяца постконцептуального возраста и дополнительные затраты на лечение одного пациента с лимфопенией умершего до постановки правильного диагноза и назначения правильного лечения [42–45]. Расчеты проведенных исследований штата Вашингтон, в котором было выполнено первое скрининговое исследование по выявлению ПИД, демонстрируют, что при рождаемости 86 600 детей/год и стоимости одного исследования по определению TREC/KREC, равной 8,16 долл. США, на скрининг тратится 741 тысяча долларов, что в свою очередь уменьшает общие затраты здравоохранения на лечение одного ребенка с 457 до 197 тысяч долларов ежегодно, что экономически выгодно. Таким образом, неонатальный скрининг на выявление ПИД не только повышает выявляемость заболевания и выживаемость новорожденных, понижает инвалидизацию, но и экономит до 43%, то есть до 316 905 долларов, бюджета штата Вашингтон от потраченного на лечение детей с ПИД [43].

■ СКРИНИНГ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Скрининг на ПИД соответствует принципам, которые необходимы для неонатального скрининга. На сегодняшний день доказана клиническая и экономическая

эффективность скрининга на ПИД в ряде стран, где он проводится посредством определения в «сухой капле» крови новорожденного маркеров Т- и В-клеточного неогенеза TREC/KREC.

В Беларуси, в г. Минске, с апреля 2023 г. начато первое в республике пилотное исследование по скринингу новорожденных на ПИД. В исследовании участвуют 5 городских роддомов с перинатальными центрами. Полученные данные будут проанализированы (РНПЦ ДОГИ), при необходимости новорожденные будут консультированы врачом-иммунологом, в дальнейшем будут проведены необходимые иммунологические исследования, поиск генетической причины ПИД, что необходимо не только для установления генетического диагноза ПИД, но и для медико-генетического консультирования членов семьи.

Выявление посредством проведения пилотного проекта одного новорожденного с ПИД и проведение ТГСК в первое полугодие его жизни позволит сэкономить до 300 000 белорусских рублей в сравнении с затратами на лечение и пребывание ребенка в стационаре. Одним из источников гемопоэтических стволовых клеток для проведения ТГСК является пуповинная кровь. Стволовые клетки пуповинной крови – уникальный донорский материал. На базе РНПЦ ДОГИ с 2010 г. работает Банк персонального хранения пуповинной крови, в котором в настоящее время находится более 1730 образцов. Уникальность пуповинной крови состоит в том, что в качестве материала для трансплантации стволовых клеток она на 100% подойдет ребенку, с вероятностью около 75% – его сиблингам, а в ряде случаев (при совпадении параметров стволовых клеток) и другому человеку, нуждающемуся в трансплантации.

Выполнение пилотного проекта по неонатальному скринингу новорожденных в г. Минске позволит установить не только истинную распространенность ПИД (которая может оказаться выше ожидаемой), но также обосновать клиническую и экономическую целесообразность внедрения полномасштабного неонатального скрининга на ПИД в Республике Беларусь.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным регистра ПИД, в Республике Беларусь зарегистрировано 22 пациента с ТКИН, из них пяти пациентам проведена ТГСК. К настоящему времени 4/5 пациентов после ТГСК живы. Таким образом, частота встречаемости данной патологии составляет приблизительно 1 на 300 000, в сравнении с мировыми данными это свидетельствует о недооцениваемости ТКИН в связи с ранней младенческой смертностью [46]. Для полномасштабного внедрения скрининга необходимо проведение пилотного исследования с установлением частоты встречаемости не более чем 1 на 50 000 новорожденных.

Ведущими причинами младенческой смертности в Республике Беларусь являются врожденные пороки развития, перинатальная асфиксия, инфекции и врожденные нарушения метаболизма. Синдромы хромосомных аномалий, врожденные пороки сердца, легочная гипоплазия и тяжелые дефекты нервной трубки составляют большинство летальных аномалий развития. В настоящее время известно, что многие нозологические синдромы первичных иммунодефицитов включают в свой симптомокомплекс различные врожденные пороки развития – это не сопутствующая патология, а, как правило, следствие одних и тех же генетических дефектов.



Скрининг новорожденных на ПИД во всем мире продолжает оставаться развивающейся областью, направленной на раннюю диагностику тяжелых нарушений иммунной системы, для которых очень важно своевременное лечение. На основании результатов выполненного исследования представляется возможным раннее выявление врожденной иммунопатологии у детей, что предотвращает вероятность развития серьезных последствий ее дальнейшего прогрессирующего развития.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Notarangelo L.D., Uzel G., Rao V.K. Primary immunodeficiencies: novel genes and unusual presentations. *Hematology. Am. Soc. of Hematol. Educ. Program.* 2019;2019:443–448. <https://doi.org/10.1182/hematology.2019000051>.
2. Buckley R.H. The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *The J. of Allergy and Clin. Immunol.* 2012;129:597–604. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.964>.
3. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022; 2:1473–1507. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>.
4. Buchbinder D., Walter J.E., Butte M.J., et al. When screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) with T cell receptor excision circles is not SCID: a case-based review. *J. of Clin. Immunol.* 2021;41:294–302. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00931-2>.
5. Laberko A.L., Rodina Yu.A., Deripapa E.V., et al. Influence of clinical and immunophenotypic variants of severe combined immunodeficiency on severity and outcomes of opportunistic infections. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2020;19(4):30–38. (In Russ.). <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-4suppl-30-38>.
6. Verbsky J.W., Baker M.W., Grossman W.J., et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008–2011). *J Clin Immunol.* 2012;32:82–8. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9609-4>.
7. Wilson D., Jungner G. Principles and practice of morbidity surveys. World Organization healthcare. Medicine. 1970.
8. Jilkina O., Thompson J.R., Kwan L., et al. Retrospective TREC testing of newborns with Severe Combined Immunodeficiency and other primary immunodeficiency diseases. *Mol Genet Metab Rep.* 2014;1:324–333. <https://doi.org/10.1016/j.jymgm.2014.07.003>.
9. Bolotin E., Annett G., Parkman R., Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(8):783–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701655>.
10. Buckley R.H., Schiff R.I., Schiff S.E., et al. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr.* 1997;130:378–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(97\)70199-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(97)70199-9).
11. Collier F., Tang M., Ponsonby A.L., Vuillermin P. Flow cytometric assessment of cord blood as an alternative strategy for population-based screening of severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr;131(4):1251–2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.09.039>.
12. Fujimoto S., Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature.* 1987;327(6119):242–3. <https://doi.org/10.1038/327242a0>.
13. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998;396(6712):690–5. <https://doi.org/10.1038/25374>.
14. Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2005;115(2):391–398. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.012>.
15. Van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007;204(3):645–55. <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>.
16. Van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J.M. PID comes full circle: Applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology.* 2011;2:1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00012>.
17. Van Zelm M.C., Szczepanski T., Van Der Burg M., Van Dongen J.J.M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine.* 2007;204(3):645–655. <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>.
18. Routes J.M., Grossman W.J., Verbsky J., et al. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *JAMA.* 2009;302(22):2465–70. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1806>.
19. Borte S., Von Döbeln U., Fasth A., et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood.* 2012;119(11):2552–2555. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371021>.
20. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C., et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology.* 2012;136:217–227.
21. Dasouki M., Jabr A., Aldakheel G., et al. TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. *Clin Exp Immunol.* 2020;202(1):60–71. <https://doi.org/10.1111/cei.13484>.
22. Nourizadeh M., Shakerian L., Borte S., et al. Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran. *Scand J Immunol.* 2018 Jun 26; e12699. doi: <https://doi.org/10.1111/sji.12699>.
23. Dorsey M., Puck J. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in the US: Current Status and Approach to Management. *International Journal of Neonatal Screening.* 2017;3(2):15. <https://doi.org/10.3390/ijns3020015>.
24. Chien Y.H., Yu H.H., Lee N.C., et al. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in Taiwan. *International Journal of Neonatal Screening.* 2017;3(3):16. <https://doi.org/10.3390/ijns3030016>.
25. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., et al. First Year of Israeli Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency—Clinical Achievements and Insights. *Front Immunol.* 2017;8:1448. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448>.
26. Blom M., Bredius R.G.M., Weijman G., et al. Introducing Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in the Dutch Neonatal Screening Program. *Int J Neonatal Screen.* 2018;4(4):40. <https://doi.org/10.3390/ijns4040040>.

27. Al-Mousa H., Al-Dakheel G., Jabr A., et al. High Incidence of Severe Combined Immunodeficiency Disease in Saudi Arabia Detected Through Combined T Cell Receptor Excision Circle and Next Generation Sequencing of Newborn Dried Blood Spots. *Front Immunol.* 2018;9:782. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00782>.
28. Göngrich C., Ekwall O., Sundin M., et al. First Year of TREC-Based National SCID Screening in Sweden. *Int J Neonatal Screen.* 2021;7(3):59. <https://doi.org/10.3390/ijns7030059>.
29. Wakamatsu M., Kojima D., Muramatsu H., et al. TREC/KREC Newborn Screening followed by Next-Generation Sequencing for Severe Combined Immunodeficiency in Japan. *J Clin Immunol.* 2022;42(8):1696–1707. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01335-0>.
30. Audrain M., Thomas C. Neonatal Screening for SCID: The French Experience. *International Journal of Neonatal Screening.* 2021;7(3):42. <https://doi.org/10.3390/ijns7030042>
31. Argudo-Ramírez A., Martín-Nalda A., González de Aledo-Castillo J.M., et al. Newborn Screening for SCID. Experience in Spain (Catalonia). *Int J Neonatal Screen.* 2021;7(3):46. <https://doi.org/10.3390/ijns7030046>.
32. Speckmann C., Neumann C., Borte S., et al. Delayed-onset adenosine deaminase deficiency: strategies for an early diagnosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Oct;130(4):991–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.004>.
33. Puck J.M. Laboratory Technology for Population-based Screening for SCID in Neonates: The Winner Is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2013;3:607–616.
34. Neonatal E., Kit T. iMedPub Journals MyTREC RealTime qPCR Assay Reagent Kit for Quantification of Human T-Cell Receptor Excision Circles (TRECs) Applications of TREC Assay Kit Contents GenenPlus MyTREC Kit versus Perkin. 2015; 2–5: <https://doi.org/10.21767/2472-1158.100004>.
35. Gutierrez-Mateo C., Timonen A., Vaahtera K., et al. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA. *Int J Neonatal Screen.* 2019;5(4):39. <https://doi.org/10.3390/ijns5040039>.
36. Tessitore M.V., Sottini A., Roccaro A.M., et al. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocced swabs. *J Transl Med.* 2017 Apr 5;15(1):70. doi: 10.1186/s12967-017-1169-9.
37. Stegantseva M.V., Guryanova I.E., Sakovich I.S., et al. Method for quantitative determination of ring molecules of T- and B-cell receptor DNA, TREC and KREC, in peripheral blood using real-time PCR. *Eurasian Journal of Oncology.* 2017;3:449–456. (In Russian)
38. Polyakova E.A., Stegantseva M.V., Lutskovich D.V., Belevtsev M.V. Evaluation of T- and B-cell Immunity Based on the T- and B-cell Receptor DNA Excision Circles (TREC/KREC) Detection Technology. *Lab. Diagnostics. Eastern Europe.* 2022;11:279–288.
39. Polyakova E., Guryanova I., Stegantseva M., et al. Quantitative determination of circular DNA fragments of the T- and B-cell receptor TREC/KREC in patients with ataxia-telangiectasia with a mutation in the ATM gene. *Immunopathology, Allergology, Infectology,* 2022;6–11. <https://doi.org/10.14427/jipai.2022.2.6>
40. Bousfiha A., Jeddane L., Al-Herz W., et al. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2015;35(8):727–38. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0198-5/>.
41. Casanova J.L., Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science.* 2007;317(5838):617–9. <https://doi.org/10.1126/science.1142963>.
42. Chan A., Scalchunes C., Boyle M., Puck J.M. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: a family perspective survey. *Clin Immunol.* 2011;138(1):3–8. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.09.010>
43. Ding Y., Thompson J.D., Kobrynski L., et al. Cost-Effectiveness/Cost-Benefit Analysis of Newborn Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Washington State. *J Pediatr.* 2016;172:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.01.029>
44. Hale J.E., Bonilla F.A., Pai S.Y., et al. Identification of an infant with severe combined immunodeficiency by newborn screening. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):1073–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.043>.
45. An der Spek J., Groenwold R.H., van der Burg M., van Montfrans J.M. TREC Based Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Disease: A Systematic Review. *J Clin Immunol.* 2015;35(4):416–30. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0152-6>.
46. Belevtsev M.V., Sharapova S.O., Guryanova I.E., et al. Immunodeficiency registry: A report from BELARUS (2007–2021). Abstract book. 20th biennial meeting of the European Society for Immunodeficiencies. 2022; WP015.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.004>
УДК 616.155.392.2+616.155.392.8]-036.11:577.152.199.2



Руденкова Т.В.¹✉, Костюк С.А.¹, Климович Н.Н.¹, Демиденко А.Н.², Суворов Д.И.³

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, Гомель, Беларусь

³ Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,
Минск, Беларусь

Распространенность полиморфизмов в генах цитохрома P450 у пациентов с острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозами

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Руденкова Т.В. – проведение исследования, анализ данных, написание текста; Костюк С.А. – редактирование текста; Климович Н.Н. – сбор материала, анализ данных, написание и редактирование текста; Демиденко А.Н. – сбор материала, анализ данных, написание текста; Суворов Д.И. – сбор материала, анализ данных, написание текста.

Подана: 28.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: t.rudenkova@mail.ru

Резюме

Цель. Установить распространенность полиморфизмов в генах цитохрома P450 (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) у пациентов с острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозами.

Материалы и методы. Обследовано 106 пациентов (дети), страдающих острым лимфобластным лейкозом, и 49 пациентов (взрослые), страдающих острым миелобластным лейкозом. Из клеток периферической крови пациентов выделяли ДНК, после амплификации фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 проводили рестрикцию полученных ампликонов и электрофоретический анализ фрагментов.

Результаты. При идентификации полиморфных вариантов гена CYP1A1 (A4889G и T6235C) и гена CYP2E1 (T7632A, G1293C и C1053T) установлено, что у пациентов обследованных групп доминирующими были аллели дикого типа. В ходе изучения полиморфизмов в гене CYP2D6 (A2549del, G1846A и C100T) было выявлено увеличение распространенности гетерозиготных и мутантных аллелей. При изучении полиморфизма A2549del в гене CYP2D6 установлено, что среди пациентов с острым лимфобластным лейкозом преобладали носители аллеля дикого типа AA (83,02%), в то время как среди пациентов с острым миелобластным лейкозом аллель дикого типа был выявлен только в 48,98% случаев. Для полиморфизма G1846A в гене CYP2D6 было установлено преимущественное распространение дикого (59,18% – 64,15%) и гетерозиготного (30,19% – 38,78%) аллелей. Нарушение структуры гена CYP2D6 в области отжига праймеров для идентификации полиморфизма C100T было выявлено в 13 образцах. В остальных успешно амплифицированных образцах (n=142) была установлена распространенность дикого CC (50,00% – 53,06%) и гетерозиготного

СТ (25,51% – 29,55%) аллелей, а также выявлена высокая частота присутствия мутантного аллеля ТТ (25,51% – 29,55%).

Заключение. У пациентов с острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозами частота выявления гетерозиготных и мутантных аллелей достоверно выше в гене CYP2D6. В генах CYP1A1 и CYP2E1 у данных пациентов доминирующими являются аллели дикого типа.

Ключевые слова: гены цитохрома P450, CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, полиморфизм, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз

Tatiana V. Rudenkova¹✉, Svetlana A. Kostiuk¹, Natalia N. Klimkovich¹,
Alla N. Demidenko², Dmitry I. Suvorov³

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

³ Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

The Prevalence of Polymorphisms in the Cytochrome P450 Genes in Patients with Acute Lymphoblastic and Acute Myeloid Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tatiana V. Rudenkova – perform of the research, data analysis, text writing; Svetlana A. Kostiuk – text editing; Natalia N. Klimkovich – collection of material, data analysis, writing and editing of the text; Alla N. Demidenko – collection of material, data analysis, writing of the text; Dmitry I. Suvorov – collection of material, data analysis, writing of the text.

Submitted: 28.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: t.rudenkova@mail.ru

Abstract

Purpose. To establish the prevalence of polymorphisms in the cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) in patients with acute lymphoblastic and acute myeloid leukemia.

Materials and methods. 106 patients (children) suffering from acute lymphoblastic leukemia and 49 patients (adults) suffering from acute myeloid leukemia were examined. DNA was isolated from the patients' peripheral blood cells, after amplification of the CYP1A1, CYP2E1 and CYP2D6 gene fragments, the resulting amplicons were restricted and the fragments were analyzed by electrophoresis.

Results. During polymorphic variants of the CYP1A1 gene (A4889G and T6235C) and the CYP2E1 gene (T7632A, G1293C and C1053T) identification, it was found that wild-type alleles were dominant in the patients of the examined groups. During the study of polymorphisms in the CYP2D6 gene (A2549del, G1846A and C100T), an increase in the prevalence of heterozygous and mutant alleles was revealed. In the course of studying the A2549del polymorphism in the CYP2D6 gene, it was found that carriers of the wild type AA allele prevailed among patients with acute lymphoblastic leukemia (83.02%), while



among patients with acute myeloid leukemia, the wild type allele was detected only in 48.98% of cases. For the G1846A polymorphism in the CYP2D6 gene, the predominant distribution of wild (59.18% – 64.15%) and heterozygous (30.19% – 38.78%) alleles were established. Violations of the CYP2D6 gene structure in the region of primer annealing for the identification of C100T polymorphism were detected in 13 samples. In the remaining successfully amplified samples (n=142), the C100T polymorphism was determined, for which the prevalence of wild (50.00% – 53.06%) and heterozygous (25.51% – 29.55%) alleles were established, as well as a high frequency of the presence of the TT mutant allele was revealed (25.51% – 29.55%).

Conclusion. In patients with acute lymphoblastic and acute myeloblastic leukemia, the frequency of heterozygous and mutant alleles detection in the CYP2D6 gene is significantly higher. In the CYP1A1 and CYP2E1 genes of these patients, wild alleles are dominant.

Keywords: cytochrome P450 genes, CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, polymorphism, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia

■ ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы являются одним из наиболее распространенных видов рака, поражающих все возрастные группы. Несмотря на успехи в области улучшения лечения острых лейкозов, причины их развития остаются малоизученными. Множество исследований, направленных на анализ генетических, социальных и экологических факторов, не позволили выявить четких критериев, ассоциированных с развитием острых лейкозов. Общепринятой является точка зрения о том, что значительная роль в развитии этой патологии принадлежит генетическим факторам, однако влияние факторов окружающей среды, в том числе и инфекционных агентов, также вносит большой вклад в процессы формирования и прогрессирования заболевания [1–4].

Острые лейкозы представляют собой злокачественные клональные заболевания органов кроветворения с вовлечением одного или нескольких клеточных ростков кроветворной системы. Эти нарушения характеризуются диффузным замещением костного мозга аномальными незрелыми и недифференцированными кроветворными клетками [1–3]. Последовательное приобретение клетками крови генетических и эпигенетических изменений обуславливает формирование специфического для заболевания фенотипа с нарушением дифференцировки и повышением пролиферации [5].

На долю острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) приходится примерно 80% от всех диагностированных лейкозов среди детей в возрасте 0–19 лет. Детские формы ОЛЛ отличаются от форм, встречающихся во взрослом возрасте, по молекулярным (цитогенетическим) характеристикам, факторам риска, лейкомогенной восприимчивости и прогнозу [6, 7].

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) чаще встречается среди взрослых и пожилых людей, без терапии быстро прогрессирует и имеет негативный прогноз [8–10].

На развитие заболевания оказывают влияние сложные взаимодействия между факторами окружающей среды и индивидуальными генетическими особенностями конкретного организма. К значимым факторам, ассоциированным с риском развития

острых лейкозов, относят присутствие в геноме пациента полиморфных вариантов генов, контролирующих синтез ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, в том числе и полиморфных вариантов генов цитохрома P450 (CYP) [7, 11].

Авторами всех исследований, посвященных оценке распространенности и влияния полиморфных вариантов генов CYP на развитие и течение заболевания, а также на формирование осложнений, подчеркивается, что полученные на определенной выборке результаты валидны только для конкретных изученных групп пациентов, так как распространенность полиморфизмов, а также характер их ассоциации с развитием лейкозов варьирует в различных этнических и расовых группах, а также может изменяться в зависимости от межгенных взаимодействий, возраста пациента, подтипа лейкоза и др.

Способность организма человека противостоять воздействию неблагоприятных факторов (токсины, канцерогены) основана на функционировании ферментных систем организма, преобразовывающих токсичные соединения в полярные водорастворимые метаболиты, которые могут быть выведены из организма. Белки суперсемейства цитохрома P450 являются ферментами, участвующими в фазе I метаболизма чужеродных соединений. Их структура, функции и активность контролируются генами CYP, среди которых широко распространены полиморфные варианты, играющие важную роль в межиндивидуальной вариабельности реакций на лекарственные средства, а также во взаимодействиях между различными лекарственными средствами (drug-drug interaction), лекарственными средствами и другими ксенобиотиками (drug-xenobiotic interaction) [11, 12].

Вариации в генах цитохрома P450 лежат в основе синтеза белков с измененной каталитической активностью, что проявляется высокой индивидуальной вариабельностью метаболизма лекарственных средств и фармакологических эффектов. Поэтому актуальным представляется изучение распространенности полиморфизмов генов цитохрома P450 среди пациентов с острыми лейкозами.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить распространенность полиморфизмов в генах цитохрома P450 (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) у пациентов с острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом основной группы исследования явились 106 пациентов с ОЛЛ в возрасте от 1 года до 17 лет, медиана возраста 5,2 года. Распределение по гендерной принадлежности равновеликое – 55 девочек (51,9%) и 51 мальчик (48,1%). Критериями включения пациентов в исследование являлось наличие диагноза ОЛЛ, проведение полихимиотерапии (ПХТ) не менее 2 месяцев по поводу основного заболевания, отсутствие токсических осложнений, включая синдромальную патологию, до начала лечения. Все пациенты основной группы на момент обследования получали специфическую терапию по протоколу ALL-MB-2015 на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» и гематологического отделения для детей государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».



Группу сравнения составили 49 пациентов с первичным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в возрасте от 25 до 64 лет (медиана возраста 42,6 года), находившихся на лечении в отделениях гематологии УЗ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии». Распределение по гендерной принадлежности равновеликое – 26 мужчин (53,06%) и 23 женщины (46,95%). На момент обследования все пациенты группы сравнения получали специфическую терапию согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов старше 18 лет с вновь диагностированным острым миелоидным лейкозом», утвержденному Министерством здравоохранения Республики Беларусь 01.06.2017 (постановление № 43).

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие периферической крови, которую забирали в стерильные вакуумные пробирки («МиниМед», РФ). Цитрат натрия или ЭДТА использовали как антикоагулянт. Пробирки с кровью замораживали и оставляли для хранения при температуре –18 °С. Выделение ДНК из крови проводили с использованием коммерческого набора реагентов NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel).

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6. Амплификацию ДНК проводили с применением специфических пар праймеров (табл. 1) и мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Республика Беларусь) на приборе QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific).

Таблица 1
Последовательности праймеров и ферменты для рестрикции фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6

Table 1
Primer sequences and restriction enzymes for CYP1A1, CYP2E1, and CYP2D6 gene fragments

Ген	№ rs	Фермент	Последовательность праймера
CYP1A1	rs1048943	BsrDI	F-CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC
			R-TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC
	rs4646903	MspI	F-TAGGAGTCTTGTCATGCCT
			R-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT
CYP2E1	rs6413432	DraI	F-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG
			R-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA
	rs3813867	Pst I	F-CCAGTCGAGTCTACATTGCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
	rs2031920	RsaI	F-CCAGTCGAGTCTACATTGCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
CYP2D6	rs35742686	MspI	F-ATGAGCTGCTAACTGAGCCC
			R-CCGAGAGCATACTCGGGAC
	rs3892097	MvaI	F-TGCCGCTTCGCCAACCCT
			R-TGCCCTTCGAGAGACTCCTC
	rs1065852	HphI	F-GTGCTGAGAGTGTCTGCC
			R-CACCCACCATCCATGTTTGC

Для идентификации уровней амплификации специфических и неспецифических фрагментов проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов. Далее проводили рестрикцию амплифицированных фрагментов и анализ результатов в 2%-ном агарозном геле методом электрофоретического анализа.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы SPSS, версия 16. Анализ категориальных признаков проводили с помощью критерия χ^2 -Пирсона (χ^2) и точного критерия Фишера (F). При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения. Количественные данные представляли в виде медианы (Me) и размаха (min...max).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая картина острого лейкоза как в основной, так и в группе сравнения характеризовалась преимущественно анемическим (76,4% и 81,6% соответственно) и геморрагическим (66,9% и 71,4% соответственно) синдромами.

В гемограмме при ОЛЛ у детей анемия установлена в 88,7% случаев (гемоглобин 86,2 (50...118) г/л), тромбоцитопения выявлена у 58,5% (55,8 (5...133) $\times 10^9$ /л). Количество лейкоцитов варьировало от лейкопении (2,9 (1,3...3,6) $\times 10^9$ /л) в 20,7% случаев до лейкоцитоза (37,4 (10,4...185) $\times 10^9$ /л) у 45,2% детей. Абсолютная нейтропения диагностирована у 19,8% пациентов (0,68 (0,29...1,37) $\times 10^9$ /л). При исследовании костного мозга установлена бластная инфильтрация в количестве от 33% до 99% при количестве миелокарицитов 257 (31...910) $\times 10^9$ /л.

В гемограмме при ОМЛ у взрослых анемия выявлена в 67,3% случаев (88,2 (57...114) г/л), тромбоцитопения – в 83,7% (33,8 (8...123) $\times 10^9$ /л), количество лейкоцитов периферической крови варьировало от лейкопении (2,9 (0,8...3,4) $\times 10^9$ /л) в 53,1% случаев до лейкоцитоза (18,6 (12,2...102) $\times 10^9$ /л) у 28,6% пациентов. Бластная инфильтрация КМ представлена в количестве от 52% до 98%. Большинство взрослых пациентов с ОМЛ (81,6%) имели промежуточный риск по кариотипу.

Таблица 2
Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP1A1 у пациентов основной группы и группы сравнения

Table 2
Results of the CYP1A1 gene polymorphic variants detection in patients of the main group and the comparison group

Ген	Генотип	Частота выявления			
		Основная группа (n=106)		Группа сравнения (n=49)	
		%	n	%	n
CYP1A1 (BsrDI) rs1048943	AA	94,33	100	93,88	46
	AG	3,77	4	6,12	3
	GG	1,89	2	0,00	0
CYP1A1 (MspI) rs4646903	TT	82,08	87	85,71	42
	TC	17,92	19	14,28	7
	CC	0,00	0	0,00	0



В образцах крови пациентов основной группы и группы сравнения с применением метода ПЦР и рестрикционного анализа была проведена идентификация полиморфных вариантов гена CYP1A1 (A4889G и T6235C). Полученные результаты, характеризующие частоту выявления различных геновариантов, представлены в табл. 2.

В ходе анализа результатов, полученных при изучении частоты выявления полиморфизма A4889G (rs1048943) в гене CYP1A1, у обследованных пациентов обеих групп доминирующим был аллель дикого типа – AA (основная группа – 94,33%, n=100; группа сравнения – 93,88%, n=46). Среди обследованных пациентов распространенность полиморфизма T6235C (rs4646903) в гене CYP1A1 составила: TT (аллель дикого типа) – 82,08% (n=87) случаев в основной группе и 85,71% (n=42) случаев в группе сравнения; гетерозиготный аллель TC – 17,92% (n=19) случаев в основной группе и 14,28% (n=7) случаев в группе сравнения. Мутантный аллель CC у обследованных пациентов не был выявлен.

Для гена CYP2E1 было проведено выявление трех полиморфизмов: T7632A (rs6413432), G1293C (rs3813867) и C1053T (rs2031920). Полученные результаты, характеризующие частоту выявления различных геновариантов, представлены в табл. 3.

Анализ полученных результатов позволил установить, что у обследованных пациентов распространенность полиморфизма T7632A (rs6413432) составила: TT (аллель дикого типа) – 87,74% (n=93) случаев в основной группе и 85,71% (n=42) случаев в группе сравнения; гетерозиготный (аллель) TA – 12,26% (n=13) случаев в основной группе и 14,29% (n=7) случаев в группе сравнения. Мутантный аллель AA у обследованных пациентов не был выявлен.

Среди обследованных пациентов обеих групп для полиморфизмов G1293C (rs3813867) и C1053T (rs2031920) доминирующими геновариантами были аллели дикого типа, частота выявления которых составила более 90%.

В ходе проведения исследований в гене CYP2D6 определяли три полиморфизма: A2549del (rs35742686), G1846A (rs3892097), C100T (rs1065852). Полученные результаты, характеризующие частоту выявления полиморфизмов A2549del и G1846A, представлены в табл. 4.

Таблица 3
Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2E1 у пациентов основной группы и группы сравнения

Table 3
Results of the CYP2E1 gene polymorphic variants detection in patients of the main group and the comparison group

Ген	Генотип	Частота выявления			
		Основная группа (n=106)		Группа сравнения (n=49)	
		%	n	%	n
CYP2E1 (DraI) rs6413432	TT	87,74	93	85,71	42
	TA	12,26	13	14,29	7
	AA	0,00	0	0,00	0
CYP2E1 (Pst I) rs3813867	GG	95,28	101	93,88	46
	GC	4,72	5	6,12	3
	CC	0,00	0	0,00	0
CYP2E1 (RsaI) rs2031920	CC	92,45	98	93,88	46
	CT	5,66	6	6,12	3
	TT	1,89	2	0,00	0

Таблица 4
Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2D6 у пациентов основной группы и группы сравнения
Table 4
Results of the CYP2D6 gene polymorphic variants detection in patients of the main group and the comparison group

Ген	Генотип	Частота выявления			
		Основная группа (n=106)		Группа сравнения (n=49)	
		%	n	%	n
CYP2D6 (MspI) rs35742686	AA	83,02	88	48,98	24
	A/del	11,32	12	32,65	16
	del/del	5,66	6	18,37	9
CYP2D6 (MvaI) rs3892097	GG	64,15	68	59,18	29
	GA	30,19	32	38,78	19
	AA	5,66	6	2,04	1

При проведении анализа результатов, полученных для полиморфизма A2549del (rs35742686), было установлено, что среди обследованных пациентов основной группы преобладают носители аллеля дикого типа AA – 83,02% (n=88) случаев, в то время как среди пациентов группы сравнения аллель дикого типа был выявлен только в 48,98% (n=24) случаев. Частота выявления гетерозиготного аллеля (A/del) составила 11,32% (n=12) случаев среди пациентов основной группы и 32,65% (n=16) случаев среди пациентов группы сравнения. Мутантный аллель (del/del) был выявлен в 5,66% (n=1) случаев среди пациентов основной группы и в 18,37% (n=9) случаев среди пациентов группы сравнения.

Распространенность полиморфизма G1846A (rs3892097) в гене CYP2D6 составила: GG (аллель дикого типа) – 64,15% (n=68) случаев среди пациентов основной группы и 59,18% (n=29) случаев среди пациентов группы сравнения; гетерозиготный аллель GA – 30,19% (n=32) случаев среди пациентов основной группы и 38,78% (n=19) случаев среди пациентов группы сравнения.

В 8 образцах (7,55%) пациентов основной группы и в 5 образцах (n=10,20%) пациентов группы сравнения после проведения амплификации фрагмента гена CYP2D6 для идентификации полиморфизма C100T (rs1065852) не было выявлено специфических ампликонов ни при анализе кривых плавления, ни при электрофоретической детекции. При этом в данных пробах фрагменты других анализируемых генов (CYP1A1, CYP2E1), а также фрагменты гена CYP2D6 для идентификации полиморфизмов A2549del (rs35742686), G1846A (rs3892097) были успешно амплифицированы. Повторное выделение ДНК и амплификация данного фрагмента гена CYP2D6 подтвердили отсутствие специфических ампликонов в данных образцах (n=13), что связано со сложной структурной организацией гена CYP2D6 и наличием межиндивидуальных особенностей структуры гена в области отжига подобранных пар праймеров. Таким образом, анализ полиморфизма C100T (rs1065852) в гене CYP2D6 проводили для 98 пациентов основной группы и 44 пациентов группы сравнения. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Присутствие дикого аллеля (CC) было выявлено у 53,06% (n=52) обследованных пациентов основной группы и у 50,00% (n=22) пациентов группы сравнения;



Таблица 5
Результаты выявления полиморфизма C100T (rs1065852) гена CYP2D6 у пациентов основной группы и группы сравнения
Table 5
Results of the CYP2D6 gene polymorphism C100T (rs1065852) detection in patients of the main group and the comparison group

Ген	Генотип	Частота выявления			
		Основная группа (n=98)		Группа сравнения (n=44)	
		%	n	%	n
CYP2D6 (HphI) rs1065852	CC	53,06	52	50,00	22
	CT	21,43	21	20,45	9
	TT	25,51	25	29,55	13

гетерозиготного геноварианта СТ – у 21,43% (n=21) обследованных пациентов основной группы и у 20,45% (n=9) пациентов группы сравнения; мутантного аллеля ТТ – у 25,51% (n=25) обследованных пациентов основной группы и у 29,55% (n=13) пациентов группы сравнения.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Ген CYP1A1 кодирует фермент (гидроксилазу), который участвует в процессах биотрансформации и метаболической активации ароматических углеводов. Полиморфизм T6235C гена CYP1A1 (CYP1A1*2A, m1 или rs4646903) характеризуется нуклеотидной заменой Т на С в положении 6235 в 3'-фланкирующей области гена CYP1A1, что создает сайт расщепления для рестриктазы MspI. Наличие полиморфизма T6235C ассоциировано с изменением уровня экспрессии гена и стабильности матричной РНК, что приводит к увеличению каталитической активности фермента [11]. В ходе проведенного исследования доминирующим геновариантом в обеих группах обследованных пациентов был дикий тип аллеля (более 80% обследованных). Статистический анализ с использованием критерия χ^2 ($\chi^2=0,32$; $p=0,65$) и точного критерия Фишера ($F=0,33$, $p=0,65$) не выявил ассоциации между носительством измененного аллеля и заболеванием ($p>0,05$).

Полиморфизм A4889G в гене CYP1A1 (CYP1A1*2C, m2, Ile462Val или rs1048943) характеризуется нуклеотидной заменой А на G в 7-м экзоне гена в кодоне 462, что приводит к замене изолейцина (Ile) на валин (Val) в положении 462 и создает сайт расщепления для рестриктазы BsrDI. Этот полиморфизм ассоциирован с двукратным увеличением активности микросомальных ферментов [7, 11, 12]. В изученных образцах преобладал дикий тип аллеля, частота выявления которого в обеих группах была выше 90%; количество образцов, в которых были идентифицированы гетерозиготный и мутантный аллели, составило от 0 до 6,1%. Статистический анализ позволил установить отсутствие взаимосвязи между присутствием различных геновариантов и заболеванием ($\chi^2=1,34$; $p=0,51$; $F=1,11$, $p=0,38$).

Полиморфизмы C1053T/G1293C в гене CYP2E1 (CYP2E1*5B; rs2031920/rs3813867) характеризуются заменами в регионе, расположенном в 5'-фланкирующей области гена, что создает сайты расщепления для рестриктаз RsaI/PstI. В экспериментах *in vitro* было показано, что присутствие данных полиморфизмов ассоциировано с изменением уровня экспрессии фермента [12–14]. Анализ частоты данных

полиморфизмов среди пациентов с ОЛЛ и ОМЛ позволил установить, что дикий тип аллелей обоих генов был преобладающим с частотой более 90%.

Полиморфизм T7632A в гене CYP2E1 (CYP2E1*6, rs6413432) характеризуется заменой нуклеотида в интроне 6, что создает сайт расщепления для рестриктазы DraI. Наличие данного полиморфизма ассоциировано со снижением активности фермента и увеличением количества одноцепочечных разрывов ДНК [12, 13]. В ходе проведенного исследования у обследованных пациентов с ОЛЛ и ОМЛ были идентифицированы дикий и гетерозиготный варианты аллелей с преобладанием частоты дикого аллеля, которая составила более 85%. Ассоциации между присутствием полиморфных вариантов в гене CYP2E1 и заболеванием установлено не было ($p > 0,05$).

Ген CYP2D6 локализован на 22-й хромосоме (22q13.2) и содержит 9 экзонов. Это высокополиморфный ген, который имеет более 100 аллельных и субаллельных вариантов [14]. Различные полиморфные варианты гена CYP2D6 ассоциированы как со статусом организмов с низким уровнем метаболизма ксенобиотиков, так и со сверхбыстрым уровнем метаболизма [11, 14].

Полиморфизм A2549del в гене CYP2D6 (CYP2D6*3, rs35742686) характеризуется заменой нуклеотида в положении 2549, что создает сайт рестрикции для фермента MspI. Присутствие в геноме данного измененного аллеля приводит к синтезу функционально неактивного фермента, что существенно замедляет метаболизм ксенобиотиков у носителя, снижает эффективность лечения, приводит к накоплению промежуточных токсичных продуктов метаболизма в организме и появлению побочных реакций [11, 14]. У пациентов основной группы исследования доминирующим был дикий тип аллеля (частота 83,02%), в то время как для пациентов с ОМЛ (группа сравнения) было установлено распределение аллелей без явного доминирования, частота выявления находилась в пределах от 48,98% для аллеля дикого типа до 18,37% для мутантного аллеля. С применением методов статистического анализа было установлено, что присутствие гетерозиготного A/del и мутантного del/del аллелей в гене CYP2D6 ассоциировано с ОМЛ ($\chi^2=19,41$; $p < 0,001$; $F=18,63$, $p < 0,001$). Так как ОМЛ поражает в основном пациентов взрослого и пожилого возраста, у которых скорость метаболических процессов снижается, то присутствие в геноме аллеля, который обуславливает синтез фермента биотрансформации со сниженной или отсутствующей активностью, является фактором, способствующим развитию заболевания.

Полиморфизм G1846A в гене CYP2D6 (CYP2D6*4, rs3892097) характеризуется заменой нуклеотида в положении 1846, в результате чего исчезает сайт расщепления для фермента MvaI. Так же, как и в случае присутствия полиморфного варианта A2549del, у носителей полиморфизма G1846A происходит синтез неактивной формы фермента [11, 14]. Анализ результатов по выявлению геновариантов для данного полиморфизма позволил установить, что дикий тип аллеля был преобладающим как у пациентов с ОЛЛ (64,15%), так и у пациентов с ОМЛ (59,18%), также высокой была и частота выявления гетерозиготного аллеля: от 30,19% до 38,78. Статистический анализ не выявил взаимосвязи данного геноварианта с развитием заболевания ($p > 0,05$).

Полиморфизм C100T в гене CYP2D6 (CYP2D6*10, rs1065852) характеризуется заменой нуклеотида С на Т в положении 100, что создает сайт расщепления для фермента NspI. Присутствие данного аллеля в геноме приводит к синтезу фермента со сниженной активностью и замедляет реакции метаболизма чужеродных соединений [14]. В связи со сложной структурой гена и его высокой межиндивидуальной



полиморфностью удалось проанализировать только 98 образцов от пациентов с ОЛЛ и 44 образца от пациентов с ОМЛ. Для данного полиморфизма была установлена высокая частота выявления мутантного аллеля ТТ в обеих группах: 25,51% для основной группы и 29,55% для группы сравнения. Частота выявления дикого аллеля составила около 53,06% и 50,00% для основной группы и группы сравнения соответственно. Статистический анализ не выявил достоверной взаимосвязи данного генотипа с развитием заболевания ($p > 0,05$).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У обследованных пациентов с ОЛЛ и ОМЛ в генах CYP1A1 и CYP2E1 преобладали аллели дикого типа (более 80% случаев для всех исследованных полиморфизмов в данных генах). Увеличение частот выявления мутантного и гетерозиготного аллелей среди пациентов с ОЛЛ и ОМЛ было установлено в гене CYP2D6. Среди пациентов с ОМЛ была установлена высокая распространенность полиморфизма A2549del в гене CYP2D6 (CYP2D6*3, rs35742686) как в форме гетерозиготного аллеля (32,65% случаев), так и в форме мутантного аллеля (18,37% случаев).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tebbi C.K. Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2256. doi: 10.3390/cancers13092256
2. Deschler B., Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107:2099–2107. doi: 10.1002/cncr.22233
3. Bispo J.A.B., Pinheiro P.S., Kobetz E.K. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020;10:a034819. doi: 10.1101/cshperspect.a034819
4. Patel M.I., Ma Y., Mitchell B., Rhoads K.F. How Do Differences in Treatment Impact Racial and Ethnic Disparities in Acute Myeloid Leukemia? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2015;24:344–349. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0963
5. Hartmann L., Metzeler K.H. Clonal hematopoiesis and preleukemia-Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):828–838. doi: 10.1002/gcc.22756
6. Marcotte E.L., Spector L.G., Mendes-de-Almeida D.P., Nelson H.H. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Front Pediatr.* 2021;9:639479. doi: 10.3389/fped.2021.639479
7. Lu J., Zhao Q., Zhai Y.J. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and risk of leukemia: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2015;8:2883–2902. doi: 10.2147/OTT.S92259
8. Bain B.J., Béné M.C. Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol.* 2019;141(4):232–244. doi: 10.1159/000496097
9. Medeiros B.C., Chan S.M., Daver N.G. Optimizing survival outcomes with post-remission therapy in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2019;94(7):803–811. doi: 10.1002/ajh.25484
10. Thol F., Klesse S., Köhler L. Acute myeloid leukemia derived from lympho-myeloid clonal hematopoiesis. *Leukemia*. 2017;31(6):1286–1295. doi: 10.1038/leu.2016.345
11. Chen H.C., Hu W.X., Liu Q.X. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and leukemia susceptibility. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(3):251–258. doi: 10.1097/CEJ.0b013e3282b72093
12. Docea A.O., Vassilopoulou L., Fragou D. CYP polymorphisms and pathological conditions related to chronic exposure to organochlorine pesticides. *Toxicol Rep.* 2017;4:335–341. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.05.007
13. Coura dos Santos R., de Fátima Silva Marques C., Koifman R. J. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism frequencies in a large Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology.* 2007;30(1):1–5. doi: 10.1590/S1415-47572007000100001
14. Nofziger C., Turner A.J., Sangkuhl K. PharmVar GeneFocus: CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;107(1):154–170. doi: 10.1002/cpt.1643



Черновецкий М.А.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Лабораторная диагностика инвазивных микозов и этиологическая структура грибковой микрофлоры, выделенной из клинически значимых видов биологического материала у детей с онкогематологической патологией

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 30.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: tchernovetski@mail.ru

Резюме

Введение. Несмотря на определенные успехи в диагностике, лечении и профилактике инвазивных микозов, они продолжают оставаться одной из актуальных проблем как отечественного, так и зарубежного здравоохранения. Немаловажную роль в этом играют широкое и не всегда рациональное применение антибиотиков, цитостатических и стероидных препаратов, нарушения иммунитета, широкое внедрение инвазивных способов оказания медицинской помощи. Особое значение инвазивные микозы имеют в качестве сопутствующей инфекции у иммунокомпрометированных лиц на фоне основной онкологической и гематологической патологии. У данной группы пациентов нередко наблюдается тяжелое клиническое течение грибковых заболеваний с уровнем летальности в отдельных случаях до 75%. При проведении лабораторной диагностики инвазивных микозов используются различные диагностические подходы, включая: классический микробиологический посев различных видов биологического материала; применение автоматизированных систем индикации и идентификации грибковой микрофлоры, а также выявления ее чувствительности к противогрибковым препаратам; использование масс-спектрометрического и молекулярно-биологического анализа; определение уровней биологических маркеров; проведение патоморфологических исследований биоптатов органов и тканей.

Цель. Основанная на анализе сведений о современных технологиях микробиологического исследования оценка результатов лабораторной диагностики сопутствующих инвазивных микозов у детей с наиболее распространенными онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также установление этиологической структуры выделенной из различного клинического материала грибковой микрофлоры.

Материалы и методы. Выделение возбудителей инвазивных микозов (микроспоров) из образцов клинически значимого биологического материала производилось



с использованием микробиологического посева в жидкие (гемафлаконы) и на твердые питательные среды с последующей родовой и видовой идентификацией в ходе применения фенотипического, биохимического, масс-спектрометрического и молекулярно-биологического методов лабораторной диагностики грибковых инфекций. В качестве клинически значимого биологического материала использовались образцы периферической венозной крови, мочи, жидкостей дыхательной системы в виде бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и трахеобронхиального дренажа (ТБД), биоптатов легких. Биоматериал был получен от детей с сопутствующими инфекционными осложнениями на фоне основной онкогематологической патологии.

Результаты. В общей сложности в течение анализируемого периода (с 2002 по 2022 год) выделено 604 штамма микромицетов: 219 штаммов из крови, 273 штамма из дыхательной системы и 112 штаммов из мочи (с учетом выявления микромицетов в количестве ≥ 1000 КОЕ/мл и включая 22 штамма при состоянии фунгурии). Основным видом выделенной микрофлоры являлись дрожжевые грибы – от 69,23% (189 из 273 культур) в содержимом БАЛ, ТБД и биоптатах легких до 90,87% (199 из 219 культур) в периферической крови. В свою очередь, среди дрожжевых грибов превалировали представители рода *Candida* (18 идентифицированных видов микроорганизмов). При этом наиболее часто из крови выделялись *Candida parapsilosis* (22,83%, 50 из 219 культур) и *Candida guilliermondii* (21,92%, 48 из 219 культур). Основными грибковыми патогенами, выделенными из дыхательной системы и мочи, были соответственно *Candida albicans* – 30,04% (82 из 273 культур) и *Candida glabrata* – 36,36% (8 из 22 культур при состоянии фунгурии). Совокупный удельный вес мицелиальной микрофлоры колебался в диапазоне от 9,13% (20 из 219 культур) в крови (с превалированием *Fusarium* spp. – 9 культур) до 30,77% (84 из 273 культур) в дыхательной системе (с превалированием *Aspergillus fumigatus* – 31 культура и *Aspergillus flavus* – 14 культур). В свою очередь, основные возбудители мукормикозов (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. и *Lichtheimia* spp.) в исследуемых видах биологического материала выделялись достаточно редко – от 0,89% в моче (1 из 112 культур) до 4,40% в содержимом дыхательной системы (12 из 273 культур).

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод об имеющемся на сегодняшний день превалировании дрожжевой флоры среди микромицетов, выделенных из различных видов исследованного биологического материала. При этом заметна тенденция к вытеснению ранее превалирующей *Candida albicans* другими, так называемыми non-albicans видами кандид. Обращает на себя внимание высокий удельный вес *Candida guilliermondii*, ранее считавшейся достаточно редким патогеном с низкой частотой выявления. При выборе диагностических подходов к проведению комплексной диагностики инвазивных микозов целесообразно предварительно учитывать этиологический спектр микромицетов, циркулирующих в конкретном медицинском учреждении.

Ключевые слова: инвазивные микозы, микромицеты, онкогематологическая патология, дети, лабораторная диагностика

Tchernovetski M.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Laboratory Diagnosis of Invasive Mycoses and the Etiological Structure of Fungal Microflora Isolated from Clinically Significant Types of Biological Material in Children with Oncohematological Pathology

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 30.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: tchernovetski@mail.ru

Abstract

Introduction. Despite some progress in the diagnosis, treatment and prevention of invasive mycoses, they continue to be one of the urgent problems of both domestic and foreign healthcare. An important role in this problem are played by the widespread and not always rational application of antibiotics, cytostatic and steroid drugs, immune disorders, the widespread introduction of invasive methods of providing medical care. Invasive mycoses are of particular importance as a concomitant infection in immunocompromised individuals against the background of the main oncological and hematological pathology. In this group of patients, a severe clinical course of fungal diseases observed, with a mortality rate of up to 75% in some cases. When conducting laboratory diagnostics of invasive mycoses, various diagnostic approaches are used, including: classical microbiological seeding of various types of biological material; automated systems for indicating, identifying fungal microflora, as well as determining sensitivity to antifungal drugs; mass spectrometric and molecular biological analysis; determination of the levels of biological markers; pathomorphological studies of biopsy specimens of organs and tissues.

Purpose. Review of modern approaches and analysis of the results of laboratory diagnosis of concomitant invasive mycoses in children with major oncological and hematological diseases treated at the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, as well as assessment of the etiological structure of the isolated fungal microflora.

Materials and methods. Isolation of pathogens of invasive mycoses (micromycetes) from samples of clinically significant biological material using microbiological inoculation in liquid (hemaflacons) and solid nutrient media. Followed generic and species identification in during the application of phenotypic, biochemical, mass-spectrometric and molecular biological methods of laboratory diagnosis of fungal infections. Samples of peripheral venous blood, urine, bronchoalveolar lavage (BAL) and tracheobronchial drainage (TBD) fluids, and lung biopsy specimens were used as clinically significant biological material. The biomaterial was obtained from children with concomitant infectious complications against the background of the main oncohematological pathology.



Results. In total, during the analyzed time period of time (from 2002 to 2022), 604 strains of micromycetes were isolated: 219 strains from the blood, 273 strains from the respiratory system and 112 strains from the urine (taking into account micromycetes amount ≥ 1000 /ml colony-forming units and 22 strains in the state of funguria). The main types of isolated microflora were yeast fungi – from 69.23% (189 out of 273 cultures) in the content of BAL, TBD and lung biopsy specimens to 90.87% (199 out of 219 cultures) in peripheral blood. In turn, representatives of the *Candida* spp. prevailed among yeast fungi (18 identified species of microorganisms). At the same time, *Candida parapsilosis* – 22.83% (50 out of 219 cultures) and *Candida guilliermondii* – 21.91% (48 out of 219 cultures) were most often isolated from the blood. The main fungal pathogens isolated from the respiratory system (BAL and TBD content, lung biopsy specimens) and urine were, respectively, *Candida albicans* – 30.04% (82 out of 273 cultures) and *Candida glabrata* – 36.36% (8 out of 22 from cultures in the state of funguria). The total specific gravity of the mycelial microflora ranged from 9.13% (20 out of 219 cultures) in the blood (with a prevalence of *Fusarium* spp. – 9 cultures) to 30.77% (84 out of 273 cultures) in the respiratory system (with a prevalence of *Aspergillus fumigatus* – 31 cultures and *Aspergillus flavus* – 14 cultures). In turn, the main causative agents of mucormycosis (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. and *Lichtheimia* spp.) in the studied types of biological material were isolated quite rarely – from 0.89% in the urine (1 out 112 cultures) to 4.40% in the contents of the respiratory system (12 out 273 cultures).

Conclusion. The results obtained allow us to conclude that the yeast flora prevails today among micromycetes isolated from various types of the studied biological material. At the same time, there is a noticeable tendency to replace the previously prevailing *Candida albicans* by other, so-called "non-albicans" *Candida* species. Attention is drawn to the high proportion of *Candida guilliermondii*, previously considered a fairly rare pathogen, with a low detection rate. When choosing diagnostic approaches for conducting a comprehensive diagnosis of invasive mycoses, one should first take into account the etiological spectrum of micromycetes circulating to a particular medical institution.

Keywords: invasive mycoses, micromycetes, oncohematological pathology, children, laboratory diagnostics

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема инвазивных микозов не теряет своей актуальности для отечественного и зарубежного здравоохранения, несмотря на определенные успехи в их диагностике и лечении на протяжении последних лет. Во многом это связано с широким и не всегда рациональным применением антибиотиков, цитостатических и стероидных препаратов, нарушениями иммунитета, активным внедрением инвазивных способов оказания медицинской помощи, общим увеличением количества пожилых и старых людей. Традиционной группой населения, наиболее подверженной развитию инвазивных микозов с высокой вероятностью летального исхода (до 75% в отдельных случаях), являются лица детского возраста с различными видами нарушения иммунитета на фоне онкогематологической патологии [1, 2].

Основным подходом к диагностике инвазивных микозов, широко используемым в микробиологических лабораториях различного профиля, является выделение

и идентификация возбудителя из биологического материала путем предварительного посева образцов биологического материала в жидкие и на твердые среды. С этой целью используется целый ряд питательных сред, включая в первую очередь базовую среду Сабуро (Sabouraud Agar) с антибиотиками и агар Чапека – Докса (Czaprek-Dox Agar). Наиболее информативным является выявление микромицетов в крови, ликворе и жидкостях, полученных из стерильных локусов [3]. С этой целью в последние годы широко используются автоматизированные системы гемокультивирования типа «BACT/ALERT» и «BACTEC», базирующиеся соответственно на колориметрической регистрации изменения окраски сенсора или уровня флуоресценции, регистрируемых при выделении углекислого газа в ходе роста микрофлоры в соответствующих стерильных емкостях (гемафлаконах типа Bact/ALERT PF Plus и BD Mycosis). В случае автоматически регистрируемого роста микроорганизмов производится их первичная идентификация (при помощи микроскопии окрашенного мазка с биоматериалом) и посев на чашки Петри с твердыми питательными средами для последующей термоинкубации с целью получения изолированных колоний так называемой чистой культуры микромицетов. К сожалению, данный процесс занимает определенный промежуток времени – от 24 часов при наличии дрожжевой микрофлоры до 14 и более суток при росте плесневых микроорганизмов. В рамках сокращения данного этапа микробиологического исследования в последние годы в ряде зарубежных лабораторий внедрены полностью автоматизированные системы посева биоматериала с последующим выделением и анализом колоний микроорганизмов (типа BD Kiestra), позволяющие существенно сократить время получения так называемой чистой культуры в количестве, достаточном для проведения дальнейшей идентификации дрожжевых грибковых патогенов [4].

Идентификация возбудителей грибковых инфекций и определение их чувствительности к противогрибковым препаратам (антимикотикам) являются одними из важнейших этапов диагностики инвазивных микозов. Современные диагностические методы включают в себя автоматизированное определение видовой принадлежности выделенных изолированных колоний дрожжевых микромицетов с использованием автоматических анализаторов типа «Vitek 2 Compact» и «Phoenix» с применением соответственно диагностической панели «Phoenix Yeast ID» и карты «Vitek 2 YST». При этом определение чувствительности выделенной дрожжевой микрофлоры к противогрибковым препаратам может осуществляться в автоматическом режиме с помощью диагностической карты «Vitek 2 AST-YS08». К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют диагностические панели к вышеуказанным анализаторам, позволяющие проводить в автоматическом режиме идентификацию плесневых грибов (мицелиальных микромицетов) и определение их антимикотикочувствительности.

Одним из широко используемых и эффективных современных диагностических подходов к выявлению чувствительности различных видов грибковой микрофлоры к противогрибковым препаратам является применение эллипсометрического метода, основанного на использовании полосок с убывающим градиентом концентрации антимикотиков (E-test), а также применение нефелометрического анализа (в варианте диагностической системы «Sensititer») при использовании 96-луночных иммунологических планшетов с различными концентрациями противогрибковых препаратов.

Весьма перспективным направлением лабораторной диагностики является видовая идентификация выделенных микромицетов на основе использования анализа



белковых структур масс-спектрометрическим методом матрикс-ассоциированной лазерной детекции/ионизации с задержкой во времени (MALDI-TOF MS) [5]. Данный метод позволяет провести исследование в течение нескольких минут с учетом номенклатуры микроорганизмов, входящих в базу данных автоматических масс-спектрометров типа «Vitek MS (bioMerieux)» и «MALDI Biotyper (Bruker)». В целом, комбинированное использование комплекса автоматизированных систем посева, выделения и идентификации грибковых микромицетов дает реальную возможность осуществить проведение микробиологической идентификации отдельных грибов (в частности *Candida spp.*) в течение 10–16 часов, позволяя тем самым врачам клинического профиля назначить своевременное адекватное лечение грибковых инфекций [4]. При этом повышается эффективность микробиологических исследований и воспроизводимость полученных результатов [6].

На фоне технического прогресса в медицине и биологии появились и успешно применяются на протяжении многих лет так называемые дополнительные методы диагностики микозов. К ним относятся молекулярно-биологические исследования и определение уровней биологических маркеров [7–9].

Традиционно используются патоморфологические исследования биопсийного, операционного и секционного материала [10–12]. При этом фиксированный формалином биоматериал подвергается обезвоживанию при помощи спиртовых растворов с последующей заливкой в парафиновые блоки, изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм, окраской гематоксилин-эозином (либо другими красителями), обзорной микроскопией с целью выявления элементов гриба. Широкое использование метода патоморфологических исследований в диагностике инвазивных микозов ограничивают определенные трудности при получении биопсийного материала у детей с онкогематологической патологией (повышенный риск возникновения внутренних кровотечений и инфекционных осложнений на фоне иммуносупрессивного состояния).

В последние годы большие надежды возлагаются на внедрение в практику работы микробиологических лабораторий молекулярно-биологических методов исследований. Использование амплификационного анализа в варианте полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет на сегодняшний день детектировать микромицеты как в нативном материале, так и в изолированных на питательных средах колониях. Разработанные и используемые на практике коммерческие ПЦР-тесты дают возможность в течение короткого периода времени (несколько часов) проводить родо- и видоспецифическую идентификацию как дрожжевых, так и мицелиальных микромицетов [13, 14]. Актуальной темой является разработка и применение комплексных мультипраймерных наборов для одновременного выявления наиболее часто встречаемых микромицетов. На сегодняшний день разработаны и применяются в ряде микробиологических лабораторий коммерческие диагностикумы, предназначенные для детекции участков геномов наиболее актуальных возбудителей инвазивных микозов дрожжевой (*Candida spp.*) и мицелиальной (*Aspergillus spp.*) этиологии [15]. При этом спектр циркулирующей в конкретном учреждении грибковой микрофлоры не всегда полностью совпадает с наименованиями микромицетов, доступных к выявлению при помощи производимых на сегодняшний день ПЦР-тест-систем. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка диагностикумов, позволяющих осуществлять одномоментное выявление различных видов грибковых патогенов

Таблица 1
Основные виды микромицетов, опосредованно детектируемые при помощи определения уровней биологических маркеров

Table 1

The main types of micromycetes, indirectly detected determining of biological markers levels

Наименование биологического маркера	Наименование детектируемых микромицетов	Наименование недетектируемых микромицетов
Галактоманнан / Galactomannan	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Geotrichium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Saccharomyces</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Mucorales</i>
1-3-бета-D-глюкан / 1-3-β-D-glucan	<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichosporon</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>Cryptococcus</i> spp., <i>Lichtheimia</i> (<i>Absidia</i>) spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp.

с учетом предварительного анализа этиологического спектра выявляемой в стационаре грибковой микрофлоры. С учетом достаточно длительного времени микробиологического выделения на твердых питательных средах изолированных колоний плесневой микрофлоры, амплификационный анализ клинически значимого нативного материала (кровь, трахеобронхиальный дренаж (ТБД), бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), ликвор) в варианте ПЦР в режиме реального времени позволяет сократить до нескольких часов лабораторную диагностику инвазивных микозов, что чрезвычайно важно для своевременного назначения адекватной противогрибковой терапии.

Отдельного внимания заслуживает выявление биологических маркеров инвазивных микозов. В первую очередь речь идет об определении в биологической жидкости (сыворотка крови, содержимое БАЛ и ТБД) уровня характерных белков микромицетов в виде галактоманнана (galactomannan) и 1-3-бета-D-глюкана (1-3-β-D-glucan). Для исследований используется иммуноферментный метод диагностики в вариантах хромогенного анализа по конечной точке и кинетического измерения хода реакции гидролиза субстрата. Выявление повышенных показателей данных биологических маркеров ассоциируется с наличием у пациентов грибковых инфекций, вызываемых в основном представителями соответственно родов *Aspergillus* и *Candida*. Тесты для выявления галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана различаются не только по принципу проведения реакции и методике учета результатов, но и по потенциальной возможности опосредованной детекции грибковых инфекций, вызываемых различными видами микромицетов. В табл. 1 приведены виды грибковых патогенов, при наличии которых в качестве этиологического агента инвазивных микозов возможно применение диагностических наборов, предназначенных для количественного выявления уровней биологических маркеров в виде галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана [16, 17]. С учетом различающегося спектра данных микромицетов имеют место рекомендации по проведению одновременного исследования биологического материала (в основном в виде сыворотки крови и жидкости БАЛ) с целью выявления в них повышенных показателей названных биологических маркеров.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основанная на анализе сведений о современных технологиях микробиологического исследования оценка результатов лабораторной диагностики сопутствующих



инвазивных микозов у детей с наиболее распространенными онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также установление этиологической структуры выделенной из различного клинического материала грибковой микрофлоры.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С учетом актуальности проблемы сопутствующих инвазивных микозов для детей с основной онкогематологической патологией, находящихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Центр), проведен анализ этиологической структуры микромицетов, выделенных из клинически значимого биологического материала за период с 2002 по 2022 год. Начало проведения анализа выявленной в биоматериале грибковой микрофлоры с 2002 года обусловлено внедрением в этот период времени автоматизированных систем культивирования микрофлоры в гемфлаконах, а также устройств для полуавтоматической и автоматической идентификации выделенных микромицетов. С 2016 года появилась возможность применения масс-спектрометрического анализа с использованием масс-спектрометра типа «Vitek MS».

Для выделения из крови микромицетов использовались двухфазные гемакультуральные флаконы фирмы Bio Rad (США), а также аналогичная продукция компаний Becton Dickinson (BACTEC PEDS PLUS/F и BACTEC Mycosis IC/F) и bioMerieux (Bact/ALERT PF Plus). Культивирование микрофлоры осуществлялось в соответствующих автоматических гемакультураторах BACTEC 120 (Becton Dickinson, США) и Bact/ALERT 3D (bioMerieux, Франция). Длительность инкубации с целью подтверждения отсутствия роста микрофлоры составляла от 5 до 14 суток в зависимости от используемых гемафлаконов и детектируемых микромицетов. В случае автоматической фиксации гемакультураторами роста микрофлоры во флаконах производились приготовление мазка исследуемого образца крови с его окрашиванием и микроскопией, а также последующий высев на чашки Петри с различными питательными средами, включая Sabouraud Dextrose Agar (с добавлением хлорамфеникола и гентамицина сульфата), CHROMAgar Candida, а также Czapek-Dox Agar. В качестве красителей наряду со стандартной окраской по Граму применялись Calcofluor White. В зависимости от используемого красителя применялась световая или люминесцентная микроскопия со 100-кратным увеличением исследуемого образца. Инкубация посевов на Sabouraud Dextrose Agar проводилась в условиях аэробного термостатирования при температуре $+30\pm 2$ °C с ежедневным визуальным учетом роста микроорганизмов на поверхностях среды в чашках Петри на протяжении до 14 суток. Для роста грибковой микрофлоры на среде CHROMAgar Candida температура инкубирования была $+35\pm 2$ °C.

При поражении дыхательной системы для выделения микромицетов использовался биологический материал в виде содержимого БАЛ и ТБД, а также биоптаты легких. Образцы биологического материала забирались в асептических условиях в специальные стерильные емкости с последующим приготовлением и окраской мазков (с помощью вышеуказанных красителей) и посевом на чашки Петри с упомянутыми твердыми питательными средами. Исследование нативного материала методически проводилось подобно анализу образцов крови. Инкубация чашек Петри с исследуемыми образцами из органов дыхательной системы проводилась в температурных

условиях и при временных параметрах, идентичных таковым при анализе биологического материала из гемафлаконов с признаками роста микрофлоры. Аналогичным образом проводилось и микробиологическое исследование мочи, за исключением выполнения микроскопии нативного материала. Основная цель данного этапа исследований – получение чистой культуры возбудителей микозов.

Родовая и, в отдельных случаях, видовая (например, при использовании среды CHROMAgar Candida) идентификация выросшей на твердых питательных средах чистой грибковой микрофлоры проводилась в первую очередь фенотипически путем оценки формы, консистенции, характера роста, цвета колоний микромицетов, структуры мицелия и спорных форм. В свою очередь, для последующего определения либо подтверждения видовой принадлежности выросших культур грибов использовались реагенты BBL Mycotube (Becton Dickinson, США), идентификационные планшеты Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция), диагностические планшеты API 20 Auxacolor и API ID32C для полуавтоматического оборудования miniAPI (bioMerieux, Франция) и идентификационные карты YST для автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (bioMerieux, Франция). В качестве альтернативных подходов к идентификации грибов использовались MALDI-TOF MS и амплификационный анализ в варианте ПЦР в режиме реального времени (PCR real-time) с применением реагентов производства АО «Вектор-Бест» (Россия) и Bruker (США). В рамках применения дополнительного теста для диагностики инвазивных микозов использовалось определение уровней галактоманна в крови и БАЛ.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом за период с 2002 по 2022 год проведен ретроспективный анализ этиологической структуры идентифицированных микромицетов, выделенных из периферической крови, содержимого структурных элементов дыхательной системы (БАЛ, ТБД, биоптаты легких) и мочи (в том числе с учетом состояния фунгурии). Результаты обнаружения различных представителей дрожжевой и плесневой микрофлоры приведены в табл. 2.

Таблица 2
Этиологическая структура выделенных грибов
Table 2
Etiological structure of isolated fungi

№ п/п	Наименование микромицетов	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2022							
		Кровь		БАЛ, ТБД, биоптат легких		Моча ≥1000 КОЕ/мл		Моча ≥1000 КОЕ/мл при фунгурии	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
1	<i>C. albicans</i>	30	13,70	82	30,03	24	21,43	3	13,63
2	<i>C. parapsilosis</i>	50	22,83	16	5,86	7	6,25	1	4,55
3	<i>C. guilliermondii</i>	48	21,91	10	3,66	17	15,18	5	22,73
4	<i>C. krusei</i>	16	7,30	17	6,23	8	7,14	–	0,0
5	<i>C. pelliculosa</i>	10	4,56	–	0,0	–	0,0	–	0,0
6	<i>C. glabrata</i>	8	3,65	21	7,69	27	24,11	8	36,36



Окончание таблицы 2

№ п/п	Наименование микромицетов	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2022							
		Кровь		БАЛ, ТБД, биоптат легких		Моча ≥1000 КОЕ/мл		Моча ≥1000 КОЕ/мл при фунгурии	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
7	<i>C. famata</i>	5	2,28	5	1,83	1	0,89	–	0,0
8	<i>C. tropicalis</i>	4	1,83	3	1,10	1	0,89	–	0,0
9	<i>C. lusitaniae</i>	4	1,83	9	3,29	1	0,89	–	0,0
10	<i>C. haemulonii</i>	–	0,0	–	0,0	1	0,89	1	4,55
11	<i>C. magnoliae</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
12	<i>C. pseudotropicalis</i>	1	0,46	1	0,37	–	0,0	–	0,0
13	<i>C. lyopolitica</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
14	<i>C. caliculosa</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
15	<i>C. kefur</i>	–	0,0	5	1,83	–	0,0	–	0,0
16	<i>C. norvengensis</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
17	<i>C. orthopsilosis</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
18	<i>C. inconspicua</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
19	<i>C. spp.</i>	–	0,0	10	3,66	9	8,04	–	0,0
20	<i>Cryptococcus spp.</i>	4	1,83	–	0,0	–	0,0	–	0,0
21	<i>Trichosporon spp.</i>	6	2,74	–	0,0	2	1,79	1	4,55
22	<i>Saccharomyc. cerevis.</i>	6	2,74	6	2,20	1	0,89	–	0,0
23	<i>Rhodotorula mucilag.</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
24	<i>Malassezia furfur</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
25	<i>A. fumigatus</i>	–	0,0	31	11,35	–	0,0	–	0,0
26	<i>A. flavus</i>	–	0,0	14	5,13	–	0,0	–	0,0
27	<i>A. niger</i>	–	0,0	6	2,20	–	0,0	–	0,0
28	<i>A. ochraceus</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
29	<i>A. sydowii</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
30	<i>A. nidulans</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
31	<i>A. spp.</i>	–	0,0	4	1,46	–	0,0	–	0,0
32	<i>Fusarium spp.</i>	9	4,11	–	0,0	10	8,93	3	13,63
33	<i>Penicillium spp.</i>	–	0,0	5	1,83	2	1,79	–	0,0
34	<i>Mucor spp.</i>	1	0,46	6	2,20	1	0,89	–	0,0
35	<i>Rhizopus spp.</i>	1	0,46	4	1,46	–	0,0	–	0,0
36	<i>Rhizomucor pusillus</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
37	<i>Epidermophyton spp.</i>	1	0,46	–	0,0	–	0,0	–	0,0
38	<i>Geotrichum capitat.</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
39	<i>Trichophyton spp.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
40	<i>Lichtheimia corymbif.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
41	<i>Paecilomyces variotii</i>	–	0,0	2	0,73	–	0,0	–	0,0
42	<i>Purpureocillium lilaci.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
43	<i>Scedosporium apiosp.</i>	–	0,0	1	0,37	–	0,0	–	0,0
44	Недифференц. плесень	6	2,74	3	1,10	–	0,0	–	0,0
ВСЕГО		219	100%	273	100%	112	100%	22	100%

При анализе приведенных в табл. 2 данных обращает на себя внимание превалирование дрожжевой микрофлоры среди микромицетов, выделенных из различных видов биологического материала, – от 69,23% (189 из 273 культур) в содержимом БАЛ и ТБД до 90,87% (199 из 219 культур) в периферической крови. Следует отметить широкий спектр выделенных грибов рода *Candida* – 18 видов без учета *Candida* spp. При этом отмечено уменьшение удельного веса широко распространенной *C. albicans* за счет возрастания этиологической роли так называемых non-*Candida* в виде *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Наиболее наглядное снижение этиологической роли *Candida albicans* в развитии сопутствующих грибковых осложнений наблюдается при анализе спектра дрожжевых культур, выделенных из крови и мочи. Целесообразно обратить внимание на случаи выделения в исследуемых видах биологического материала (преимущественно из крови и из содержимого дыхательной системы) *Saccharomyces cerevisiae*, так называемых «пекарских дрожжей», широко используемых при приготовлении хлебобулочной продукции. В целом, на долю лишь двух представителей рода *Candida* в виде *Candida parapsilosis* и *Candida guilliermondii* приходится около половины всех случаев фунгемий. Одной из выявленных особенностей выделения кандид из образцов крови пациентов Центра является высокий удельный вес *C. guilliermondii* (21,92%, 48 из 219 культур), традиционно считающейся в большинстве стационаров редким возбудителем инвазивных микозов с частотой выявления в кровяном русле, не превышающей обычно несколько процентов. На фоне выраженного превалирования выделения дрожжевых микромицетов из крови и мочи спектр грибковой флоры в дыхательной системе имеет существенные отличия за счет достаточно высокого удельного веса плесневой микрофлоры (30,77%, 84 из 273 культур), основным представителем которой являются аспергиллы, с ожидаемым преобладанием *A. fumigatus* (31 из 59 культур) и *A. flavus* (14 из 59 культур). Среди общего количества выделенных из клинического материала представителей мицелиальной (филаментозной) микрофлоры обращают на себя внимание возбудители рода *Fusarium*, преобладающие среди филаментозной флоры, обнаруженной в моче (10 из 13 культур) и в крови (9 из 20 культур). Имеет определенное своеобразие и этиологический профиль грибковой микрофлоры, выделенной из мочи (в количестве, равном или превышающем 1000 КОЕ/мл), где наиболее часто встречаемым видом грибковой микрофлоры была *Candida glabrata* (24,11%, 27 из 112 микромицетов). С учетом имеющейся вероятности контаминации образцов мочи при их заборе и с целью повышения достоверности этиологической значимости детекции грибковой микрофлоры в образцах мочи был проведен дополнительный анализ грибковых патогенов при состоянии фунгурии, подтвердивший ранее выявленный удельный вес *Candida glabrata* (36,36%, 8 из 22 культур). Принимая во внимание появившиеся в последние годы данные о росте числа заболеваний, вызываемых так называемыми муковыми грибами (относятся к порядку *Mucorales*), определенный интерес представляют частота и спектр обнаружения данного вида микрофлоры у детей с онкогематологической патологией. За весь период анализа данных общее количество обнаруженных мукомицетов составило 15 культур, включая представителей родов *Rhizopus* (5 штаммов), *Mucor* (8 штаммов), а также единичные культуры *Rhizomucor pusillus* и *Lichtheimia corymbifera*. В целом следует отметить незначительный уровень обнаружения в биологическом



материале возбудителей мукормикозов – 0,89% (1 из 112 культур) в моче, 0,91% (2 из 219 культур) в крови и 4,40% (12 из 273 культур) в дыхательной системе.

Весьма показательными были результаты анализа ежегодной частоты выявления микромицетов. За рассматриваемый период времени данный показатель варьировал от 27 фунгемий в 2009 году до 3 случаев обнаружения в крови микромицетов в 2022 году. При средней частоте выявления микромицетов в крови за наблюдаемый период времени в количестве 10,43 случая в год за последние 3 года обнаружено лишь 11 случаев фунгемий (включая по 4 эпизода в 2020 и 2021 годах). Одной из причин такого снижения является внедрение в 2017 году в работу Центра программы борьбы с инфекционными осложнениями, предусматривающей введение видеоконтроля за соблюдением противоэпидемических мероприятий при оказании медицинской помощи (в частности при проведении мероприятий, связанных с нарушением целостности кожных покровов и уходом за центральными венозными и периферическими катетерами), а также профилактическое назначение противогрибковых препаратов пациентам из групп риска по развитию инвазивных микозов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопутствующие инфекционные осложнения, вызываемые различными видами дрожжевой и плесневой микрофлоры, продолжают оставаться одной из проблем в лечении детей с основной онкогематологической патологией. Имеет место вытеснение наиболее изученной и распространенной *Candida albicans* другими видами дрожжевых микромицетов, отличающихся, как правило, большей агрессивностью в плане развития клинических проявлений инвазивных микозов и устойчивостью к применению противогрибковых препаратов. Внедрение и комплексное использование современных диагностических подходов в виде масс-спектрометрического анализа, ПЦР-диагностики и определения уровней биологических маркеров позволит повысить эффективность специфической диагностики грибковых инфекций. Принимая во внимание родовое и видовое разнообразие выявляемых в биологическом материале микромицетов, комплексную лабораторную диагностику инвазивных микозов целесообразно проводить с учетом этиологической структуры грибковой микрофлоры, циркулирующей в конкретном медицинском учреждении. Этиологический состав микрофлоры, выделенной у пациентов с онкогематологической патологией (включая *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.), позволяет предположить повышение эффективности диагностики грибковых поражений за счет одномоментного определения уровней биологических маркеров в виде галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана. Спектр циркулирующих в медицинском учреждении микромицетов рационально учитывать также при выборе соответствующих коммерческих либо при разработке отечественных ПЦР-тест-систем в режиме реального времени.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Von Lilienfeld-Toal M., Wagener J., Einsele H. Invasive fungal infection. *Deutsches Arzteblatt International*. 2019;116:271–278.
2. Supatharawanich S., Narkbunnam N., Vathana N. Invasive Fungal Diseases in Children with Acute Leukemia and Severe Aplastic Anemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2021;13(1):39–47.
3. Clancy C.J., Nguyen M.N. Diagnosis Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(5):1909–1917.
4. Muters N.N., Hodiament C.J., de Jong M.D. Performance of Kiestra Total Laboratory Automation Combined with MS in Clinical Microbiology Practice. *Annals of Laboratory Medicine*. 2014;34:111–117.
5. Honsig C., Selitsch B., Hollenstein M. Identification of Filamentous Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Evaluation of Three Different Sample Preparation Methods and Validation of an In-House Species Cutoff. *Journal of Fungi*. 2022;8:383–393.
6. Jacot D., Sarton-Loheac G., Coste A.T. Performance evaluation of the Becton Dickinson Kiestra IdentifA/SusceptA. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27:1167.e9–1167.e17.
7. Lass-Flori C., Samardzic E., Knoll M. Serology anno 2021 – fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27:1230–1241.
8. Kord M., Salehi M., Khodovaisy S. Epidemiology of yeast species causing bloodstream infection in Tehran, Iran (2015–2017); superiority of 21-plex PCR over Vitek 2 system for yeast identification. *Journal of Medical Microbiology*. 2020;69:712–720.
9. Paterson T.F., Donnelly J.P. New concept in diagnostics for invasive Mycoses: non-culture-based methodologies. *Journal of Fungi*. 2019;5(is. 9):9–18.
10. Roden C., Schuetz A.N. Histopathology of fungal diseases of the lung. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2017;34(6):530–549.
11. Roy P., Das S., Sharma S. Revisiting the utility of histopathological examination of biopsy: a necessity in microbiology. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017;11(5):DC16–DC18.
12. Zhang D., Li X., Zhang J. Characteristics of Invasive Pulmonary Fungal Diseases Diagnosed by Pathological Examination. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2021, art. ID 5944518.
13. Seo H., Kim J.Y., Son H.-J. Diagnostic performance of real-time polymerase chain reaction assay in blood for invasive aspergillosis and mucormycosis. *Mycoses*. 2021;64(is. 12):1554–1562.
14. White P.L., Price J.S., Cordey A., Backx M. Molecular Diagnosis of Yeast Infections. *Current Fungal Infections Reports*. 2021;15:67–80.
15. Carvalho-Pereira J., Fernandes F., Araujo R. Multiplex PCR Based Strategy for Detection of Fungal Pathogen DNA in Patients with Suspected Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*. 2020;6:308.
16. Mercier T., Castognola E., Marr K.A. Defining Galactomannan Positivity in Updated EORTS/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(suppl. 2):89–94.
17. Lamothe F., Akan H., Cruciani D. Assessment of the role of 1,3-β-D-Glucan Testing for the Diagnosis of Fungal Infections in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(suppl. 2):89–94.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.006>
УДК 616.344-002-031.84:[611.34.018.73+612.112.94]:575.21



Нижегородова Д.Б.^{1,2}✉, Цеханович Д.А.², Шулейко А.Ч.¹, Старостин А.М.¹,
Ванслав М.И.¹, Иванчик Г.И.¹, Величко А.В.^{1,2}, Зафранская М.М.^{1,2}

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Методологический подход к фенотипированию лимфоидных клеток слизистой оболочки кишки у пациентов с болезнью Крона

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта и окончательное редактирование текста рукописи – Нижегородова Д.Б.; проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта текста – Цеханович Д.А.; сбор и статистическая обработка клинических и морфологических данных, забор биологического материала – Старостин А.М.; проведение иммунологических исследований – Ванслав М.И.; проведение диссоциации ткани и гематологических исследований – Иванчик Г.И.; проведение диссоциации ткани – Величко А.В.; концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи – Зафранская М.М.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.1 «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2», № госрегистрации 20230295.

Подана: 31.03.2023
Принята: 12.09.2023
Контакты: nzh@tut.by

Резюме

Введение. В настоящее время общепринятым подходом к оценке иммунного статуса является характеристика лимфоидных клеток периферической крови. Вместе с тем актуальными остаются исследования показателей локального мукозального иммунитета желудочно-кишечного тракта при иммунопатологических состояниях и последующее сопоставление полученных данных с таковыми циркулирующих лимфоидных клеток – для выявления взаимосвязи локальных реакций с системными эффектами. В статье представлена методология выделения и предложен алгоритм фенотипирования интраэпителиальных лимфоидных клеток (IEL) и лимфоидных клеток собственной пластинки слизистых оболочек (LPL) тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона.

Цель. Оценить фенотипический состав лимфоидных клеток периферической крови и слизистой оболочки тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона.

Материалы и методы. Материал исследования – биопсийный материал тонкой и толстой кишки, а также периферическая кровь 10 пациентов с болезнью Крона в возрасте 28,0 (22,7÷36,8) года, из них – 6 мужчин и 4 женщины. Мукозальные лимфоидные клетки получали путем комбинированной программной диссоциации тканей кишки. Иммунофенотипирование лимфоидных клеток осуществляли с использованием набора моноклональных антител и проточного цитометра. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. Основная популяция мукозальных лимфоидных клеток тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона представлена CD3⁺Т-лимфоцитами, долевое содержание которых коррелировало с количеством Т-лимфоцитов периферической крови ($R=0,7$; $p<0,05$). При этом среди Т-клеток IEL тонкой кишки выявлена инверсия Т-хелперов и Т-киллеров. В обоих отделах кишки установлено увеличение количества минорных популяций $\gamma\delta$ IEL (преимущественно за счет V δ 1⁺Т-клеток) относительно LPL ($p<0,01$) и мукозально-ассоциированных CD161⁺Т-клеток относительно периферической крови ($p<0,05$). Мукозальные В-лимфоциты и НК-клетки локализовались преимущественно среди LPL-компартамента, при этом в толстой кишке большая половина В-клеток определялась как В₁-лимфоциты ($p<0,01$).

Заключение. С использованием предложенного алгоритма фенотипирования у пациентов с болезнью Крона выявлены изменения в основных и минорных популяциях мукозальных лимфоидных клеток врожденного и приобретенного иммунитета, которые, предположительно, вовлекаются в формирование аутоиммунного воспаления в тонкой и толстой кишке, а также циркулируют в периферической крови и могут являться диагностически значимыми маркерами развития рецидива заболевания.

Ключевые слова: мукозальные лимфоидные клетки, диссоциация, алгоритм фенотипирования, болезнь Крона, аутоиммунная патология

Darya B. Nizheharodava^{1,2}✉, Dmitriy A. Tsekhanovich², Anatoliy Ch. Shuleika¹,
Andrey M. Starastsin¹, Marharyta I. Vanslau¹, Galina I. Ivanchyk¹, Alesia V. Vialichka^{1,2},
Marina M. Zafranskaya^{1,2}

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
Minsk, Belarus

Methodological Approach to the Mucosal Lymphoid Cells Phenotyping in Patients with Crohn's Disease

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and study design, conducting immunological studies and statistical data processing, writing the original version and final editing of the manuscript – Darya B. Nizheharodava; immunological studies, writing the original text version – Dmitriy A. Tsekhanovich; clinical and morphological data collection and statistical processing, sampling of biological material – Anatoliy Ch. Shuleika; clinical and morphological data collection and statistical processing, sampling of biological material – Andrey M. Starastsin; immunological studies – Marharyta I. Vanslau; tissue dissociation and hematological studies – Galina I. Ivanchyk; tissue dissociation – Alesia V. Vialichka; concept and study design, final editing of the manuscript – Marina M. Zafranskaya.

Funding. The work was financially supported by the state research program "Biotechnologies-2", subprogram 3.1 "Molecular and cellular biotechnologies-2", registration number 20230295.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: nzh@tut.by

Abstract

Introduction. Currently the generally accepted approach to the immune status assessment is the characterization of lymphoid cells in the peripheral blood. However, the investigation of local mucosal gut immunity under immunopathological conditions



remain highly relevant as well as its following comparison with circulating lymphoid cells for the identification the relationship between local reactions and systemic effects. This article presents a methodology for mucosal cells isolation and proposed an algorithm for the phenotyping of intraepithelial lymphoid cells (IEL) and lamina propria lymphoid cells (LPL) obtained from the small and large intestine in patients with Crohn's disease.

Purpose. To evaluate the phenotype of peripheral blood and mucosal lymphoid cells of the small and large intestine in patients with Crohn's disease.

Materials and methods. The study material was biopsy of the ileum and colon as well as peripheral blood from 10 patients with Crohn's disease, aged 28.0 (22.7÷36.8) years, including 6 men and 4 women. Mucosal lymphoid cells were obtained by combined mechanical and enzymatic dissociation of intestinal tissues. Lymphoid cells were immunophenotyped using a set of monoclonal antibodies and a flow cytometer. Statistical data processing was done using the Statistica 8.0 program.

Results. The major population of mucosal lymphoid cells in the small and large intestine of patients with Crohn's disease was represented by CD3⁺T-lymphocytes, the percentage of which correlated with the number of peripheral blood T-lymphocytes ($R=0.7$; $p<0.05$). At the same time, the inversion of T-helpers and T-killers was revealed among T-cells of enteric IEL. An increase in the number of minor $\gamma\delta$ IEL subsets (mainly due to V δ 1⁺T-cells) as compared to LPL ($p<0.01$) and mucosa-associated CD161⁺T-cells as compared to peripheral blood ($p<0.05$) was established in both parts of the intestine. Mucosal B-lymphocytes and NK-cells were localized predominantly among the LPL compartment, while more than half of the B-cells were defined as B1-lymphocytes in the colon ($p<0.01$).

Conclusion. Using the proposed phenotyping algorithm changes in the major and minor subsets of mucosal lymphoid cells of innate and acquired immunity were detected in patients with Crohn's disease, assuming their involvement in the gut autoimmune inflammation as well as circulation in the peripheral blood what may be used as diagnostic significant markers for disease progression.

Keywords: mucosal lymphoid cells, dissociation, phenotyping algorithm, Crohn's disease, autoimmune pathology

■ ВВЕДЕНИЕ

В последнее время внимание исследователей все больше привлекает мукозальная иммунная система, а также открывающиеся новые возможности использования ее отдельных компонентов (М-клетки, дендритные клетки, интраэпителиальные лимфоциты, изолированные лимфоидные фолликулы, Пейеровы бляшки и др.) в качестве таргетной терапии [1]. Система мукозального иммунитета представляет собой лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками, которая является отдельной и самой большой (более 400 м²) автономной структурой иммунной системы, эволюционно сформировавшейся как первая линия защиты организма и выполняющей как протективную, так и иммунорегуляторную роль. Имунокомпетентная ткань слизистых оболочек представлена организованными структурами и отдельными клеточными элементами, при этом около 80% всех иммунокомпетентных клеток организма локализовано именно в слизистой оболочке желудочно-кишечного

тракта (ЖКТ), а их роль в формировании и поддержании иммунопатологических состояний до сих пор остается предметом активных дискуссий [2, 3].

Современная классификация выделяет интраэпителиальные лимфоидные клетки (IEL – англ. Intraepithelial Lymphoid Cells) и лимфоидные клетки собственной пластинки слизистых оболочек (LPL – англ. Lamina Propria Cells), включающих гетерогенные популяции Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, мукозально-ассоциированных и врожденных лимфоидных клеток, иммунобиология которых до сих пор остается предметом активного изучения и выходит за рамки классической иммунологии [4].

Спектр функций лимфоидных клеток варьирует от иммунорегуляции и формирования периферической толерантности к потенциальным аутоантигенам до эффекторного поражения ткани. Контактруя с иммунными и неиммунными клетками в тканях, мукозальные лимфоциты участвуют в иммунологическом надзоре, активации воспалительной реакции, тканевом гомеостазе, метаболизме, морфогенезе, репарации и регенерации (ремоделировании) тканей, выполняют барьерную функцию, а также активно взаимодействуют с нервной системой и микробиотой [5, 6]. В то же время неконтролируемое действие лимфоидных клеток может привести к повреждению тканей, хроническому воспалению, метаболическим заболеваниям, аутоиммунитету и онкопатологическим процессам, что определяется тонкой регуляцией лимфоцит-медиированного ответа для поддержания целостности организма [7, 8].

В настоящее время особый интерес представляют лимфоидные клетки, которые непосредственно активно вовлекаются в патогенез воспалительных заболеваний кишечника, в том числе аутоиммунной природы – болезнь Крона (БК), язвенный колит, целиакия. До сих пор не выяснено, каким образом субпопуляционный состав IEL и LPL изменяется при инициации и развитии аутоиммунных процессов, ассоциированных со слизистыми оболочками организма, и каковы его отличия от физиологического распределения клеток. Результаты исследования экспериментальных моделей указывают на роль IEL и LPL в поддержании аберрантного иммунного ответа на микробиоту и последующем развитии БК, первичная заболеваемость которой в Республике Беларусь составляет 1,5:100 000 [9]. Во время хронического воспаления ЖКТ воспалительными дендритными клетками и макрофагами синтезируется избыточный уровень провоспалительных интерлейкинов (IL-12, IL-18, IL-23 и IL-1 β), что приводит к аккумуляции и активации врожденных лимфоидных клеток, секретирующих повышенный уровень цитокинов Th1- и Th17-профиля, инициации хемотаксиса нейтрофилов и повреждению или трансформации ткани, одним из исходов которых может являться колит-ассоциированный рак. Лимфоидные клетки слизистых оболочек способны также вступать во взаимодействие с неиммунными клетками (эпителиальными клетками и фибробластами), иницируя секрецию медиаторов воспаления (IL-18) и реорганизацию ткани, в том числе эпителиальную пролиферацию и фиброз [10–12]. При этом слизистые оболочки являются местом развития не только индукторной, но и эффекторной фазы мукозального иммунитета [13].

Принимая во внимание отсутствие единого подхода к фенотипированию лимфоидных клеток слизистой оболочки кишки при иммунопатологических состояниях, актуальным представляется изучение особенностей гетерогенной популяции мукозальных клеток в локальном микроокружении аутоиммунного воспаления при БК. В данной статье представлена методология выделения и предложен алгоритм фенотипирования IEL и LPL тонкой и толстой кишки у пациентов с БК.



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить фенотипический состав лимфоидных клеток периферической крови и слизистой оболочки тонкой и толстой кишки у пациентов с БК.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явился биопсийный материал тонкой и толстой кишки, а также периферической крови 10 пациентов с БК в возрасте 28,0 (22,7÷36,8) года, из них – 6 мужчин и 4 женщины, находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Диагноз подтверждался морфологическим исследованием биопсийного материала. Пациенты имели следующие особенности локализации патологического процесса: толстокишечное поражение (3 пациента), тонкокишечное (4 пациента), тонко-толстокишечное (3 пациента). Из них у 2 пациентов определялся воспалительный фенотип заболевания, у 4 – стенозирующий/стриктурирующий и у 3 – пенетрирующий/свищевой фенотип; у 2 пациентов диагностировалось перианальное повреждение. Все исследуемые пациенты предоставили информированное согласие на взятие биологического материала и участие в выполнении научного исследования.

Выделение лимфоидных клеток

Для выделения IEL слизистую оболочку отделяли от биопсийного материала и измельчали на мелкие куски размером 0,5 см², которые инкубировали в растворе для первичной диссоциации, содержащем 5 mM этилендиаминуксусной кислоты (Sigma, Германия), 5%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Германия), 1 mM дитиотреитола (Sigma, Германия) (рис. 1.1) в течение 20 мин. при 37 °C при непрерывном помешивании (рис. 1.2). Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр CellStrainer с порами 100 мкм, отмывали при 300 g в течение 10 мин. и разводили для иммунофенотипирования (рис. 1.3).

Для выделения LPL использовали ткань кишки после первичной диссоциации и набор ферментов Lamina Propria Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Образцы ткани инкубировали в культуральной среде RPMI-1640 (Gibco, Германия) в объеме 0,3 г/мл с добавлением 200 мкл фермента D, 100 мкл фермента R и 25 мкл фермента A в течение 30 мин. при 37 °C при непрерывном перемешивании (рис. 1.4). После инкубации пробирки с образцами помещали в программный диссоциатор gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Германия) и выполняли дезагрегацию ткани (рис. 1.5). Полученную клеточную суспензию LPL центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. (рис. 1.6) и разводили для иммунофенотипирования (рис. 1.7).

Мононуклеары периферической крови выделяли методом центрифугирования на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, Германия) при 300 g в течение 30 мин. с последующим 2-кратным отмыванием клеток в физиологическом растворе с добавлением 5% ЭТС.

Жизнеспособность выделенных клеток определяли по окрашиванию трипановым синим.

Метод проточной цитометрии

Субпопуляции лимфоцитов определяли с применением панелей моноклональных антител CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/



Рис. 1. Методология выделения IEL и LPL из ткани кишки у пациентов с БК
Fig. 1. Methodology of IEL and LPL isolation from CD patients' gut tissue

CD3-PC5, $\gamma\delta$ TCR-FITC/ $\alpha\beta$ TCR-PE/ $V\delta$ 1TCR-PC7/ $V\delta$ 2TCR-PB/CD3-APC-A750/ CD45-KrO, CD5-PC7, CD161-PB450, CD45-BrV (Beckman Coulter, США) и проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для иммунофенотипирования 100 мкл цельной крови или клеточной суспензии IEL или LPL добавляли в пробирку с моноклональными антителами, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин. при температуре 18–25 °C. В периферической крови эритроциты лизировали раствором VersaLyse (Beckman Coulter, США) в течение 10 мин. Результаты регистрировали на проточном цитометре на 10 000 лимфоидных клеток.



Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 8.0. Сравнение независимых групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Корреляционный анализ осуществляли с применением рангового коэффициента корреляции непараметрических данных Спирмена (R). За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Алгоритм фенотипирования лимфоидных клеток ткани кишки и периферической крови методом проточной цитометрии

В ходе проведенной механической и ферментативной диссоциации тканей тонкой и толстой кишки получены IEL и LPL, которые наряду с выделенными лимфоидными клетками периферической крови фенотипировали для определения основных и минорных популяций иммунных клеток (табл. 1), принимая во внимания их возможную патогенетическую роль в развитии аутоиммунного воспаления ЖКТ.

Лимфоидные клетки являются гетерогенной популяцией и включают натуральные киллеры (NK-клетки), Т- и В-лимфоциты, среди которых выделяют различные субпопуляции. Среди клеток врожденного иммунитета исследовали NK-клетки, TNK-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки ($V\delta 1^+T$ -, $V\delta 2^+T$ - и $V\delta 3^+T$ -клеточные субпопуляции), MAIT-клетки и B_1 -клетки, а приобретенного иммунитета – Т-лимфоциты (Т-хелперы, Т-киллеры) и B_2 -клетки (основная популяция В-лимфоцитов).

Интерпретацию результатов проточной цитометрии проводили согласно алгоритму фенотипирования субпопуляций лимфоидных клеток, представленному на рис. 1. Для выделения гейта единичных клеток и отделения дуплетов и клеточного дебриса анализ начинали с построения точечной диаграммы плотности параметров области и высоты прямого светорассеяния (рис. 2А) среди всех клеточных событий.

Таблица 1
Фенотип основных и минорных популяций мукозальных и циркулирующих лимфоидных клеток
Table 1
Phenotype of major and minor mucosal and circulating lymphoid cells populations

Субпопуляции лимфоидных клеток		Фенотип
Натуральные киллеры	NK-клетки	CD45 ⁺ CD56 ⁺
	TNK-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺
$\alpha\beta$ T-лимфоциты	T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺
	T-хелперы	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
	T-киллеры	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
	MAIT-клетки	CD45 ⁺ Lin ⁻ CD127 ⁺ CD161 ⁺
$\gamma\delta$ T-лимфоциты	$\gamma\delta$ T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺
	$V\delta 1^+T$ -клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 1^+$
	$V\delta 2^+T$ -клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 2^+$
	$V\delta 3^+T$ -клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 1^-V\delta 2^-$
В-лимфоциты	B_2 -клетки	CD45 ⁺ CD19 ⁺
	B_1 -клетки	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺

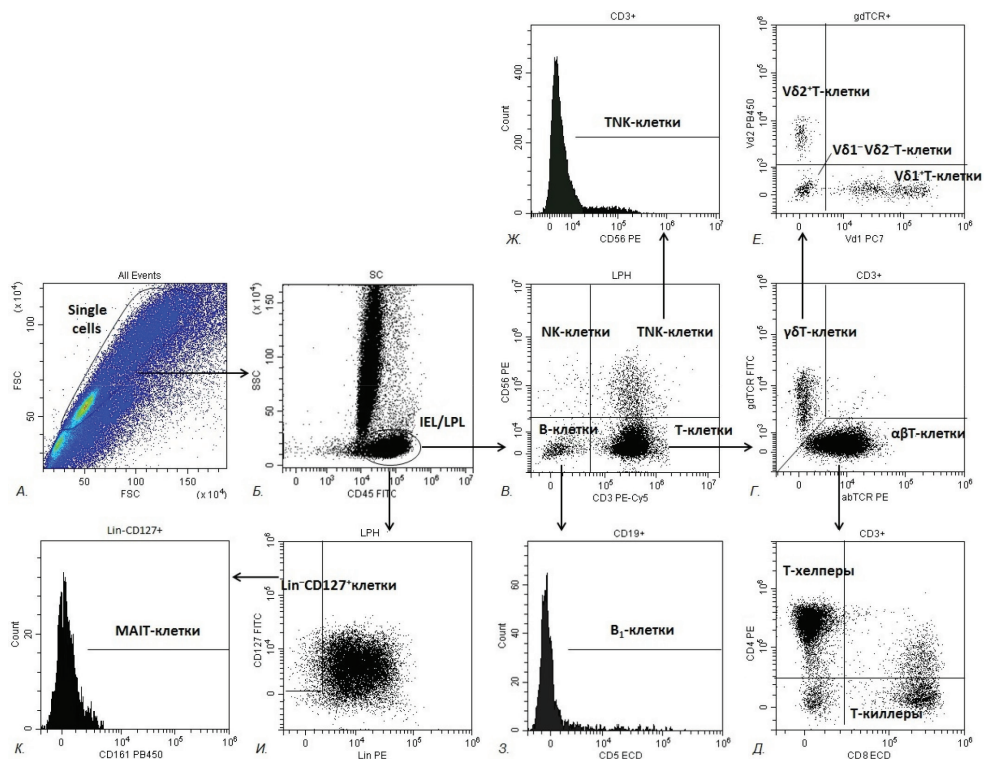


Рис. 2. Алгоритм фенотипирования мукозальных (IEL, LPL) и циркулирующих лимфоидных клеток у пациентов с БК
Fig. 2. The algorithm of mucosal (IEL, LPL) and circulating lymphoid cells phenotyping in CD patients

Примечание: А – гейт единичных клеток, Б – CD45⁺лимфоидные клетки, В – основные популяции лимфоидных клеток (CD56⁺NK-клетки, CD3⁺CD56⁺NK-клетки, CD3⁺T-лимфоциты и CD19⁺B-лимфоциты), Г – субпопуляции αβТ- и γδТ-лимфоцитов, Д – CD3⁺CD4⁺T-хелперы и CD3⁺CD8⁺T-киллеры среди гейта αβТ-лимфоцитов, Е – субпопуляции Vδ1⁺T-, Vδ2⁺T- и Vδ1-Vδ2 (Vδ3⁺)T-клетки среди гейта γδТ-лимфоцитов, Ж – CD3⁺CD56⁺TNK-клетки среди гейта Т-лимфоцитов, З – субпопуляция CD19⁺CD5⁺ В₁-клеток среди гейта CD19⁺B-лимфоцитов, И – гейт Lin⁺CD127⁺ клеток, К – субпопуляция CD161⁺MAIT-клеток среди гейта Lin⁺CD127⁺ клеток.

Лимфоидные клетки (IEL, LPL или лимфоциты периферической крови) идентифицировали по яркой флуоресценции общего лейкоцитарного антигена CD45 и низкому боковому рассеянию (рис. 2Б), среди которых выделяли основные популяции: CD56⁺NK-клетки, CD3⁺T-лимфоциты и CD19⁺B-лимфоциты (рис. 2В).

В зависимости от экспрессии типа Т-клеточного рецептора (αβTCR⁺γδTCR⁻ или αβTCR⁻γδTCR⁺) среди Т-клеток различали субпопуляции αβТ- и γδТ-лимфоцитов (рис. 2Г). Анализ клеточного состава основных αβТ-лимфоцитов включал определение CD3⁺CD4⁺T-хелперов и CD3⁺CD8⁺T-киллеров (рис. 2Д), в то время как среди минорных γδТ-лимфоцитов по экспрессии δ-цепи Т-клеточного рецептора идентифицировали субпопуляции Vδ1⁺T-, Vδ2⁺T- и Vδ1-Vδ2 (Vδ3⁺)Т-клетки (рис. 2Е). Наряду с этим в общем гейте Т-лимфоцитов оценивали количество CD3⁺CD56⁺TNK-клеток, комбинирующего рецепторный аппарат и свойства NK-клеток и Т-лимфоцитов (рис. 2Ж),



а в общем гейте В-лимфоцитов определяли минорную популяцию CD19⁺CD5⁺B₁-клеток (рис. 23). Популяцию лимфоидных клеток, экспрессирующую α-цепь рецептора интерлейкина-7 (CD127, рис. 2И) и активирующий рецептор CD161 (рис. 2К) при отсутствии экспрессии линейных маркеров (Lin⁻), определяли как мукозально-ассоциированные инвариантные МАИТ-клетки.

Количественная характеристика мукозальных и циркулирующих лимфоидных клеток у пациентов с БК

С использованием описанного алгоритма фенотипирования проведено определение количественного содержания IEL, LPL в тонкой и толстой кишке, а также циркулирующих лимфоидных клеток в периферической крови у пациентов с БК. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Установлено, что в тонкой кишке пациентов с БК количество CD3⁺Т-клеток среди IEL статистически значимо увеличивалось по сравнению с таковым среди LPL, а также IEL толстой кишки и коррелировало с процентным содержанием Т-лимфоцитов в периферической крови ($R=0,7$; $p<0,05$). При этом в субпопуляционном составе Т-клеток наблюдалась выраженная инверсия Т-хелперов и Т-киллеров среди IEL тонкой кишки ($p<0,05$), соотношение которых составило 1:2, в то время как в остальных тканевых компартментах тонкой и толстой кишки количество Т-клеточных субпопуляций оставалось равным (1:1) и отличалось от стандартного соотношения в периферической крови, определяемое как 2:1.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов, свидетельствующими об абсолютном большинстве CD3⁺Т-лимфоцитов среди IEL и снижении их процента в LPL, но при этом демонстрирующими активное вовлечение Т-лимфоцитов обоих компартментов в патогенез воспалительных заболеваний кишечника [14–16]. Локализация IEL способствует их быстрому реагированию на антигенные структуры, в том числе компоненты микробиоты, контактирующие с эпителием ЖКТ. Т-лимфоциты слизистых оболочек имеют преимущественно эффекторный фенотип, проявляют различную цитотоксическую активность, включая аллореактивную и вирус-специфическую, обеспечивают помощь В-клеткам, играют роль в поддержании толерантности и регулируют функцию эпителиальных клеток, тем самым осуществляя роль иммунного надзора или первой линии защиты. Однако присутствие среди Т-клеток аутореактивных клонов у пациентов с БК приводит к тому, что вместо первой линии защиты происходит повреждение эпителия в результате нарушения баланса между иммунологической толерантностью и эффекторным иммунным ответом [17, 18].

Если в здоровых тканях αβТ-лимфоциты представлены в основном цитотоксическими CD3⁺CD8⁺Т-клетками, играющими важную защитную роль в обнаружении и устранении поврежденных эпителиальных клеток и противоинфекционной защите, то при БК наблюдается инфильтрация эпителиального слоя слизистых оболочек CD3⁺CD4⁺Т-хелперами. Это, предположительно, связано с хронической антигенной стимуляцией условно-патогенными бактериями ЖКТ и свидетельствует об аутоиммунной воспалительной реакции. В выполненном исследовании Т-хелперы преимущественно определялись в толстой кишке пациентов с БК (табл. 2). CD4⁺Т-хелперы являются основными медиаторами клеточного иммунитета и играют ключевую роль в активации других иммунных клеток, таких как В-клетки и цитотоксические Т-клетки,

Таблица 2
Содержание лимфоидных клеток в тонкой, толстой кишке и периферической крови у пациентов с БК, Me (25÷75)%_o
Table 2
The number of lymphoid cells in the ileum and colon as well as in peripheral blood of CD patients, Me (25÷75)%_o

Популяции лимфоидных клеток	Тонкая кишка		Толстая кишка		Периферическая кровь	p
	IEL	LPL	IEL	LPL		
	1	2	3	4		
CD3 ⁺ T-cells, %	88,0 (59,8÷94,0)	67,0 (50,3÷82,9)	74,7 (65,1÷80,1)	86,9 (70,8÷90,2)	68,2 (66,3÷68,3)	p ₁₋₂ <0,01 p ₁₋₅ <0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-helpers, %	28,1 (13,9÷35,6)	55,3 (47,2÷67,3)	47,9 (17,9÷54,7)	49,6 (38,7÷54,1)	63,2 (59,8÷65,6)	p ₁₋₂ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-killers, %	64,7 (60,0÷76,3)	58,9 (36,7÷62,4)	47,1 (36,3÷51,1)	48,9 (40,9÷56,8)	33,4 (25,5÷33,7)	p ₁₋₂ <0,01
γδTCR ⁺ T-cells, %	9,3 (5,3÷10,8)	1,2 (1,0÷9,5)	24,0 (17,3÷35,6)	1,4 (0,6÷6,2)	8,5 (2,5÷10,6)	p ₁₋₂ =0,06 p ₃₋₄ <0,01
CD19 ⁺ B-cells, %	6,6 (4,7÷14,2)	30,8 (17,0÷46,2)	21,1 (14,9÷26,3)	13,3 (8,8÷15,0)	12,8 (11,8÷14,7)	p ₁₋₂ <0,05
CD19 ⁺ CD5 ⁺ B ₁ -cells, %	4,8 (2,3÷7,4)	9,3 (5,6÷20,3)	5,6 (3,7÷10,0)	54,7 (29,8÷62,1)	16,8 (14,9÷19,7)	p ₃₋₄ <0,01
CD56 ⁺ NK-cells, %	12,6 (11,1÷19,3)	4,7 (4,3÷8,2)	14,1 (11,8÷19,8)	34,4 (19,9÷38,9)	14,3 (12,8÷17,9)	p ₁₋₂ <0,01 p ₃₋₄ <0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ TNK-cells, %	12,1 (10,2÷17,9)	20,3 (13,1÷54,7)	13,7 (3,8÷19,3)	37,7 (27,0÷39,8)	0,2 (0,1÷0,3)	p ₃₋₄ <0,05
CD161 ⁺ cells, %	24,3 (4,8÷46,8)	н/о	24,1 (20,7÷34,7)	н/о	5,4 (1,3÷8,1)	p ₁₋₅ <0,05 p ₃₋₅ <0,05

Примечания: Me (25÷75)%_o – медиана, 25-й и 75-й перцентили; IEL – интраэпителиальные лимфоциты; LPL – лимфоциты собственной пластинки; p-значение – уровень статистически значимых различий; н/о – значение не определялось; CD – кластер дифференцировки; TCR – T-клеточный рецептор; NK-клетки – натуральные киллеры.

модулируя антиген-специфический иммунный ответ. При этом аутоиммунное воспаление при БК в основном ассоциируется с повышенной активацией и аберрантной пролиферацией Т-хелперов 1-го и 17-го типов, эффекторные реакции которых опосредованы продукцией провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-23, IFN-γ и IL-17). Пилотные исследования показывают эффективность блокады или истощения CD4⁺T-клеток в процессе лечения пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [19].

Тем не менее все больше доказательств свидетельствует о роли механизмов цитотоксичности в повреждении ткани кишечника, что согласуется с выявленным в данном исследовании превалярованием Т-киллеров в тонкой кишке у пациентов с БК. Т-киллеры реализуют свои эффекторные реакции посредством таких высокоактивных биомолекул, как перфорин, гранзимы, гранулизин, Fas-лиганд и фактор некроза опухоли-α. Более того, провоспалительные цитокины, высвобождаемые Т-киллерами, могут быть вовлечены в разрушение эпителиального барьера, индуцируя апоптоз эпителиальных клеток, что приводит к увеличению проницаемости кишечника. Высокие уровни цитотоксичности подтверждают существующую концепцию о том, что при болезни Крона поражается весь желудочно-кишечный тракт [20].

Наряду с описанными изменениями в слизистой оболочке общего количества Т-лимфоцитов установлена тенденция к повышению относительного количества



неклассических интраэпителиальных клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ T-клеточный рецептор ($\gamma\delta^+IEL$), в тонкой кишке ($p=0,06$) и выявлено статистически значимое увеличение процента данной популяции в эпителии толстой кишки относительно такового в *lamina propria* (табл. 2). Наряду с этим удельное содержание мукозальных интраэпителиальных $\gamma\delta$ T-клеток коррелировало с количеством аналогичных клеток, циркулирующих в периферической крови пациентов с БК ($R=0,6$; $p<0,05$). Во всех случаях повышение тканевых $\gamma\delta^+IEL$ происходило преимущественно за счет субпопуляции $V\delta 1^+T$ -клеток, количество которых составило более 40% в тонкой кишке и более 60% в толстой кишке. При этом общее количество $\gamma\delta^+IEL$ коррелировало с локализацией патологического процесса ($R=-0,6$; $p<0,05$) и тяжестью течения заболевания ($R=0,7$; $p<0,01$).

Выявленное повышение минорной популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов не только в периферической крови, но и в тканях согласуются с Regner et al. [21], характеризующих внетимическое происхождение некоторых лимфоидных клеток слизистой оболочки ЖКТ, достигающих в отдельных случаях до 50% от лимфоидных клеток. В отличие от $\alpha\beta$ T-лимфоцитов, $\gamma\delta$ T-клетки комбинируют в себе свойства клеток врожденного и приобретенного иммунитета: их рецепторный аппарат частично схож с таковым у антигенпрезентирующих клеток и NK-клеток по экспрессии паттерн-распознающих и киллерных/ингибиторных рецепторов, однако, обладая специфическим T-клеточным рецептором, данная популяция способна распознавать антигенные структуры, подобно классическим T-лимфоцитам [22].

Экспериментальные исследования достаточно противоречивы в подтверждении вовлечения $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в патогенез БК, что частично объясняется высокой гетерогенностью данной популяции, в связи с чем их клиническое значение до конца не выяснено. При этом функции субпопуляций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в тонкой и толстой кишке могут различаться, что объясняется их высокой функциональной пластичностью, а про- или противовоспалительный профиль клеток может определяться локальным микроокружением, в том числе выраженностью аутоиммунного воспаления слизистых оболочек [23].

Большинство авторов поддерживают гипотезу об иммунорегуляторной функции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в ЖКТ, которая заключается в переключении синтеза антител на продукцию иммуноглобулина класса А (IgA), поддержании гомеостаза эпителия посредством взаимодействия с $\alpha\beta$ T-лимфоцитами, эпителиальными клетками и клиренса некротических клеток, регуляции барьерной функции и участия в формировании периферической толерантности. На экспериментальных моделях ВЗК продемонстрирована протективная роль $\gamma\delta$ T-клеток, характеризующаяся лимитированием воспалительной реакции посредством синтеза противовоспалительных цитокинов и факторов роста, а также предотвращением транслокации инвазивных комменсальных и патогенных бактерий через эпителий ЖКТ за счет стимуляции синтеза антимикробных пептидов клетками Панета [24]. Тем не менее воспалительное микроокружение, формируемое изменением субпопуляционного состава $\alpha\beta$ T-лимфоцитов в слизистых оболочках кишки, наряду с микробной стимуляцией, может приводить к aberrантной активации $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, их активному хоумингу через кишечный эпителий и *lamina propria* посредством окклюдин-зависимого механизма и вовлечению в прогрессирование заболевания путем реализации своих цитотоксических эффекторных реакций. Кроме того, избыточная регенерация эпителия, медиированная

γδТ-клетками, способствует образованию псевдоподиев, атипичной зазубренной поверхности и развитию серьезных осложнений заболевания, таких как колоректальный рак [25].

Помимо характеристики клеточных механизмов адаптивного иммунитета проведен анализ гуморального звена специфического иммунитета. У пациентов с БК установлена преимущественная локализация В-клеток среди LPL тонкой кишки ($p < 0,05$) и субпопуляции В1-клеток среди LPL толстой кишки относительно IEL-компартамента ($p < 0,01$) (табл. 2). При этом количество последних коррелировало с наличием у пациентов периаанального повреждения ($R=0,8$; $p < 0,01$).

Известно, что В-клетки могут непосредственно усилить Т-клеточный ответ, продуцируя цитокины и синтезируя антитела, в частности секреторный IgA для контроля кишечной микробиоты в ЖКТ, а также функционировать в качестве локальных антигенпрезентирующих клеток и организовывать образование третичных лимфоидных структур, поддерживающих долговременный иммунитет. В-лимфоциты могут играть незаменимую роль в представлении антигена слизистой оболочке и выполнять иммунорегуляторную роль в контроле аутоагрессивного воспаления ЖКТ при БК. При низкой концентрации данной популяции в слизистой оболочке происходит нарушение распознавания антигенов кишечника, что ставит под угрозу первую линию защиты – снижение антителообразования и нарушение формирования иммунологической памяти. Кроме того, снижение антигенпрезентирующей функции В-клеток может способствовать превращению Т-лимфоцитов в аутореактивные клетки. С другой стороны, повышение количества популяции В₁-клеток усиливает продукцию низкоаффинных антител в ответ на бактериальные патогены, способные выступать в роли аутоантител и участвовать в антитело-опосредованном повреждении слизистых оболочек при БК [26].

Еще одна популяция врожденного иммунитета – NK-клетки – характеризовалась повышением их процентного содержания среди LPL толстой кишки. При этом более 50% клеток идентифицировались как TNK-клетки. В тонкой кишке не выявлено статистически значимых изменений в количестве NK- и TNK-клеток (табл. 2). В отличие от других лимфоцитов, NK-клетки не экспрессируют антиген-специфические рецепторы, но обладают сильным цитотоксическим потенциалом, подобно CD8⁺Т-клеткам, и осуществляют первую линию защиты наряду с γδТ-лимфоцитами. Помимо этого, для них характерна продукция большого количества Т-клеточных цитокинов, играющих важную роль в модуляции адаптивного иммунитета и способных опосредовать как эффекторные, так и иммуносупрессивные реакции. NK-клетки не являются ключевыми в повреждении ткани при БК, однако, синтезируя большое количество γ-интерферона и фактора некроза опухоли-α, способствуют нарушению кишечной толерантности и тем самым усиливают Т-клеточный ответ [27]. Большое внимание авторов привлекает субпопуляция TNK-клеток, коэкспрессирующая Т-клеточный рецептор и типичные для NK-клеток поверхностные рецепторы и, подобно γδТ-лимфоцитам, проявляющая свойства как врожденного, так и приобретенного иммунитета. TNK-клетки распознают фосфо- или гликолипиды и реализуют быструю защиту путем продукции широкого спектра цитокинов. Парадоксальность биологической функции заключается в том, что TNK-клетки могут быстро высвободить большое количество Th1-, Th2-, Th17- и регуляторных цитокинов, в связи с чем способствуют как развитию, так и супрессии клеточно-медиированного иммунного



ответа в зависимости от распознаваемых антигенов и локального микроокружения. Согласно данным литературы, количество TNK-клеток увеличивается в воспаленной lamina propria у пациентов с БК, что полностью согласуется с полученными нами результатами [28].

В данном исследовании среди IEL как тонкой, так и толстой кишки ¼ часть клеток определялась как мукозально-ассоциированные CD161⁺T-лимфоциты (табл. 2), которые сохраняют способность реагировать только на воспалительные цитокины [29]. Показано, что количество CD161⁺T-клеток в ткани кишки превышало удельное содержание таковых в периферической крови пациентов ($p < 0,05$), что согласуется также с исследованиями Iiai T. et al., которые предполагают участие CD161⁺T-лимфоцитов в усилении воспалительной реакции и хронизации процесса при БК, а также выявили корреляцию количества CD161⁺клеток с клинической активностью заболевания [30]. В связи с этим уровень экспрессии CD161⁺ на T-клетках у пациентов с БК может служить еще одним маркером активности аутоиммунного интестинального воспаления.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из современных подходов к персонифицированной медицине, изучение функционирования отдельных компонентов системы мукозального иммунитета представляется перспективным с точки зрения поиска новых терапевтических мишеней или биомаркеров патологического процесса с использованием предложенного алгоритма фенотипирования клеток при БК. Выявленные изменения субпопуляционного состава лимфоидных клеток в тонкой и толстой кишке у пациентов с БК также различались в зависимости от их локализации (эпителиальный компартмент или lamina propria). Показано преимущественное вовлечение основных и минорных популяций интраэпителиальных T-лимфоцитов в развитие аутоиммунного воспаления, в то время как в lamina propria патогенетически значимыми могут являться В-лимфоциты и NK-клетки, что требует дальнейших исследований для установления их роли в патогенезе БК.

Принимая во внимание, что в нормальных условиях кишечная среда толерантна к большинству чужеродных нетоксичных антигенов, выявленные изменения количественного состава лимфоидных субпопуляций могут являться триггерными механизмами нарушения целостности слизистого барьера, транслокации кишечных бактерий и увеличения числа местных и системных воспалительных реакций. При этом установленная корреляционная взаимосвязь дает основание предполагать миграцию мукозальных лимфоидных клеток и их циркуляцию в периферической крови, что может использоваться в качестве диагностически значимых маркеров прогрессирования заболевания и открывает новые возможности применения мукозальных лимфоидных клеток в таргетной терапии и профилактической медицине.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wu R., Zhang D., Tu E. The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *The International Journal of Oral Science*. 2014;6(3):125–32. DOI: 10.1038/ijos.2014.48.
2. Kabat A.G., Pott J., Maloy K.J. The Mucosal Immune System and Its Regulation by Autophagy. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:240. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00240.
3. Wiarda J., Loving C.L. Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1048708. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1048708.

4. Mörbe M, Jørgensen P, Fenton T. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT), diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*. 2021 Jul;14(4):793–802. DOI: 10.1038/s4138502100389-4.
5. Quatrini L, Vivier E, Ugolini S. Neuroendocrine regulation of innate lymphoid cells. *Immunological*. 2018;33:120–136. DOI: 10.1111/imr.12707
6. Jakob M.O., Murugan S., Klose C.S.N. Neuro-Immune Circuits Regulate Immune Responses in Tissues and Organ Homeostasis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:308. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00308.
7. Ebbo M., Crinier A., Vély F. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *The National Center for Biotechnology*. 2017;17(11):665–678. DOI: 10.1038/nri.2017.86.
8. Sonnenburg J., Sonnenburg E. Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*. 2019;366(6464):9255. DOI: 10.1126/science.aaw9255.
9. Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V. Metabiotics as a Natural Development of a Probiotic Concept. *Gastroenterology*. 2017;15:35–39. DOI: 10.3402/mehd.v24i0.20399. (In Russian)
10. Geremia A., Arancibia-Cárcamo C. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1296. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01296.
11. Li Y., Li H. Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology*. 2018;99:134–144. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.05.003.
12. Poniewierska-Baran A., Tokarz-Deptuła B. The role of innate lymphoid cells in selected disease states – cancer formation, metabolic disorder and inflammation. *Archives of Medical Science*. 2021;17(1):196–206. DOI: 10.5114/aoms.2019.89835.
13. Vivier E., Artis D. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054–1066. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
14. Hu M.D., Edelblum K.L. Sentinels at the Frontline: the Role of Intraepithelial Lymphocytes in Inflammatory Bowel Disease. *Immunology and Inflammation*. 2017;3(6):321–334. DOI: 10.1007/s40495-017-0105-2.
15. Sundin J., Rangel I. Aberrant mucosal lymphocyte number and subsets in the colon of post-infectious irritable bowel syndrome patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2014;49(9):1068–75. DOI: 10.3109/00365521.2014.926982.
16. Chiarolla C. et al. M. Pro-inflammatory innate-like T cells are expanded in the blood and inflamed intestine in Crohn's Disease. *MedRxiv*. 2022. DOI: 10.1101/2022.05.12.22274864.
17. Regner E.N., Ohri N. Functional intraepithelial lymphocyte changes in inflammatory bowel disease and spondyloarthritis have disease specific correlations with intestinal microbiota. *Arthritis Research & Therapy*. 2018;20(1):149. DOI: 10.1186/s13075-018-1639-3.
18. García-Hoz C., Crespo L., Lopez N. The Intracellular Intensity of CD3 on Aberrant Intraepithelial Lymphocytes Is a Prognostic Factor of the Progression to Overt Lymphoma in Refractory Celiac Disease Type II (Pre-Enteropathy-Associated T Cell Lymphoma). *Digestive Diseases*. 2020;38:490–499. DOI: 10.1159/000506305
19. Chao Z., Yuan Q., Hua Y. CD4CD8αα IELs: They Have Something to Say. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:2269. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02269.
20. Sandler R., Hansen J. Intraepithelial and Lamina Propria Lymphocytes Do Not Correlate With Symptoms or Exposures in Microscopic Colitis. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2022;13(3). DOI: 10.14309/ctg.0000000000000467.
21. Regner E. H. Functional intraepithelial lymphocyte changes in inflammatory bowel disease and spondyloarthritis have disease specific correlations with intestinal microbiota. *Arthritis Research & Therapy*. 2018;20(1):149. DOI: 10.1186/s13075-018-1639-3.
22. Vandereyken M., James O., Swamy M. Mechanisms of activation of innate-like intraepithelial T lymphocytes. *Mucosal Immunology*. 2020;13(5):721–731. DOI: 10.1038/s41385-020-0294-6.
23. Sánchez-Castañón M., Castro B. G., Toca M. Intraepithelial lymphocytes subsets in different forms of celiac disease. *Autoimmunity Highlights*. 2016;7(1):14. DOI: 10.1007/s13317-016-0085-y.
24. Nizheharodova D.B., Tsekanovich D.A., Starostin A.M., Dybov O.G., Zafranskaya M.M. Subpopulations of circulating γδ-lymphocytes in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of the Belarusian State University, Ecology*. 2022;4:58–68. (In Russian)
25. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Immunology*. 2011;11(7):445–56. DOI: 10.1038/nri3007.
26. Nizheharodava D.B., Adamovich H.Yu., Ivanchyk G.I., Dybau A.G., Kulnich S.S., Shadrina V.K., Varabei A.U., Zafranskaya M.M. Antibody profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2020;3:30–38. DOI: 0.14427/jipai.2020.3.30. (In Russian).
27. Jaemoon K., Heounjeong G., Won A. Benign Indolent CD56-Positive NK-Cell Lymphoproliferative Lesion Involving Gastrointestinal Tract in an Adolescent. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2014;48(1):73–76. DOI: 10.4132/JKoreanJPathol.2014.48.1.73
28. Cooper R., Papworth N.J. Counting Intraepithelial Lymphocytes: A Comparison Between Routine Staining and CD3⁺56⁺ Immunohistochemistry. *International Journal of Surgical Pathology*. 2020;28(4):367–370. DOI: 10.1177/1066896919894644.
29. Haitao M., Yuan Q., Hua Y. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. *Wiley-Blackwell*. 2020;109(2):339–347. DOI: 10.1002/JLB.3RU0220-111.
30. Iiai T., Watanabe H., Suda T. CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;129(1):92–98. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01886.x



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.007>
УДК 616.36-004



Дорошевич К.Н., Калинин А.Л., Михайлова Е.И., Трофимова Н.В., Сенникова А.В.,
Першенкова О.С.✉, Мирге М.Н.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Клинико-лабораторная характеристика пациентов с циррозом печени: ее зависимость от этиологии и класса тяжести по Чайлду – Пью

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Дорошевич К.Н. – статистическая обработка данных, написание текста; Калинин А.Л. – сбор и анализ результатов; Михайлова Е.И. – сбор и анализ результатов, написание текста; Трофимова Н.В. – сбор и обработка данных; Сенникова А.В. – сбор и обработка данных; Першенкова О.С. – сбор и обработка данных, редактирование; Мирге М.Н. – сбор и обработка данных.

Подана: 14.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: 70bssr@tut.by

Резюме

Введение. Цирроз печени (ЦП) в настоящее время является одной из весьма важных медико-социальных проблем в экономически развитых странах, так как входит в число шести основных причин смерти пациентов в возрасте от 35 до 65 лет, которая в среднем встречается с частотой от 15 до 30 случаев на каждые 100 тысяч населения. По этой причине изучение различных аспектов ЦП остается по-прежнему актуальной и востребованной проблемой современной медицины.

Цель. Выявить особенности клинико-лабораторных проявлений цирроза печени в зависимости от этиологии и класса тяжести заболевания по Чайлду – Пью.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ 333 историй болезни пациентов с ЦП, находившихся на лечении в стационарах г. Гомеля в период 2019–2021 гг.

Результаты. Установлено, что при достижении развернутой стадии заболевания (стадия В по Чайлду – Пью) при алкогольном ЦП, в отличие от вирусного, отмечены более высокие уровни лейкоцитов ($p=0,03$), общего билирубина ($p=0,021$), активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТП; $p=0,001$) и коэффициента де Ритиса ($p=0,02$). При другой этиологии ЦП, в отличие от алкогольного, характерен более низкий уровень активности ГГТП ($p=0,001$), а в отличие от вирусного – более низкие значения аланинаминотрансферазы (АлАТ; $p=0,01$) и высокие показатели холестерина ($p=0,03$). На терминальной стадии (стадия С по Чайлду – Пью) дифференциация возможна уже по клинической картине, для которой для вирусного ЦП, в отличие от алкогольной и другой этиологии, менее характерен кожно-желтушный синдром ($p=0,003$ и $p=0,004$ соответственно).

Заключение. Лабораторные проявления ЦП позволяют заподозрить этиологическое происхождение заболевания уже на развернутой стадии, в то время как характерные клинические проявления появляются только на поздних этапах развития заболевания.

Ключевые слова: цирроз печени, этиология, класс по Чайлду – Пью, лабораторные анализы, биохимия

Kristina N. Doroshevich, Andrey L. Kalinin, Elena I. Mikhailova, Natalia V. Trofimova,
Alina V. Sennikova, Volha S. Pershenkova✉, Marina N. Mirge
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Clinical and Laboratory Characteristics of Patients with Liver Cirrhosis: Its Dependence on Etiology and Child – Pugh Severity Class

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kristina N. Doroshevich – statistical data processing, text writing; Andrey L. Kalinin – data collection and analysis; Elena I. Mikhailova – data collection and analysis, text writing; Natalya V. Trofimova – data collection and processing; Alina V. Sennikova – data collection and processing; Olga S. Pershenkova – data collection and processing, editing; Marina N. Mirge – data collection and processing, editing.

Submitted: 14.03.2023
Accepted: 12.09.2023
Contacts: 70bssr@tut.by

Abstract

Introduction. Cirrhosis of the liver is currently one of the most important and social problems in economically developed countries, as it is among the six main causes of death of patients aged 35 to 65 years, which on average occurs from 15 to 30 cases for every 100 thousand of the population. For this reasons, the study of various aspects of liver cirrhosis remains an urgent and in-demand problem of modern medicine.

Purpose. To reveal peculiarities of clinical and laboratory manifestations of liver cirrhosis depending on etiology and Child – Pugh class of disease severity.

Materials and methods. A retrospective analysis of 333 case histories of patients with cirrhosis who were treated in hospitals in the city of Gomel in the period 2019–2021 was carried out.

Results. It was found that upon reaching the advanced stage of the disease (Child – Pugh stage B) with alcoholic LC, in contrast to viral LC, higher levels of leukocytes ($p=0.03$), total bilirubin ($p=0.021$), GGTP ($p=0.001$) were noted and de Ritis coefficient ($p=0.02$). In a different etiology of LC, in contrast to alcoholic LC, a lower level of GGTP ($p=0.001$) is characteristic, and in contrast to viral LC, lower ALT values ($p=0.01$) and high cholesterol levels ($p=0.03$) are characteristic. At the terminal stage (stage C according to Child – Pugh), differentiation is possible already by the clinical picture, for which, unlike alcoholic and other etiologies, viral LC is less characteristic of cutaneous icteric syndrome ($p=0.003$ and $p=0.004$, respectively).

Conclusion. Laboratory manifestations of LC make it possible to suspect the etiological origin of the disease only at the advanced stage of the disease, while characteristic clinical manifestations appear only at the later stages of the development of LC.

Keywords: liver cirrhosis, etiology, Child – Pugh grade, laboratory analysis, biochemistry



■ ВВЕДЕНИЕ

ЦП в настоящее время является одной из самых важных медико-социальных проблем в экономически развитых странах, так как входит в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 65 лет, которая в среднем встречается с частотой от 15 до 30 случаев на каждые 100 тысяч населения [1–3]. В Республике Беларусь ежегодно ЦП диагностируется в среднем у 1,5 тысячи человек. По приросту смертности ЦП занимает 3-е место, которая встречается в 35 случаях на 100 тысяч населения [4, 5].

Опасность ЦП состоит в закономерно развивающихся печеночно-клеточной недостаточности и портальной гипертензии, которые являются причиной развития тяжелых осложнений (асцит, печеночная энцефалопатия, кровотечение из варикозно расширенных вен (ВРВ) пищевода и др.), которые приводят к ухудшению качества жизни, инвалидизации и смерти. По этой причине изучение различных аспектов ЦП остается по-прежнему актуальной и востребованной проблемой современной медицины [1].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить особенности клинико-лабораторных проявлений цирроза печени в зависимости от этиологии и класса тяжести заболевания по Чайлду – Пью.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ 333 историй болезни пациентов с ЦП (медиана возраста составила 55,0 года; $q^{25}=45$; $q^{75}=62$), находившихся на лечении в стационарах г. Гомеля за период 2019–2021 гг. Верификация диагноза ЦП и определение этиологии заболевания производились в соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения», постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 54 [6].

Статистическая обработка материала совершалась на персональном компьютере с помощью программного обеспечения Statistica 7.0. Количественные признаки обрабатывались с использованием непараметрических критериев – медианы (М) и квартилей (q^{25} , q^{75}). Достоверность различий между 3 независимыми выборками и более оценивалась с помощью множественного сравнения с использованием для качественных признаков критерия хи-квадрат (χ^2), для количественных признаков – критерия Крускала – Уоллиса (H). Для апостериорного сравнения групп применялся критерий Данна. Различия между сравниваемыми группами считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди обследованных пациентов с ЦП класс тяжести А по Чайлду – Пью выставлен у 70 (21,02%) человек, класс тяжести В и С – у 176 (52,85%) и 87 (26,13%) пациентов соответственно, из которых 162 (48,65%) пациента были женского и 171 (51,35%) – мужского пола.

Среди пациентов с ЦП класса А по Чайлду – Пью алкогольная этиология имела место в 6 (8,57%) случаях (1-я группа), вирусная – 5 (7,14%) случаях (2-я группа), другая – в 56 (80,0%) случаях (3-я группа) и смешанная – в 3 (4,29%) случаях (4-я группа). Медиана возраста пациентов в 1-й группе составила 58,5 ($q^{25}=50$; $q^{75}=72$) года, 2-й группе –

41 ($q^{25}=38$; $q^{75}=43$) год, 3-й группе – 43 ($q^{25}=39$; $q^{75}=43$) года, 4-й группе – 58 ($q^{25}=47$; $q^{75}=64,5$) лет ($N=10,49$; $p=0,02$). Несмотря на наличие достоверных различий между группами по критерию Крускала – Уоллиса и тенденции к снижению медианы возраста у госпитализированных пациентов с вирусным ЦП, апостериорное сравнение групп статистически значимых различий не обнаружило ($p>0,05$).

Около половины пациентов из этой группы (47 человек, 67,14%) жаловались на боли и дискомфорт в эпигастрии и правом подреберье. Несколько реже отмечались диспепсический (32 пациента, 45,71%) и астеновегетативный (29 пациентов, 41,43%) синдромы.

При объективном осмотре небольшие отеки выявлялись у 5 (7,14 %) человек, легкий асцит – у 24 (34,29%) пациентов. У 6 (8,57%) человек отмечалась желтуха разной степени выраженности. Варикозы расширенных вен (ВРВ) были выявлены у 35 (50,0%) пациентов. Все варикозы расширенных вен локализовались в пищеводе. У 21 (30,0%) человека размер вен соответствовал I степени, у 8 (11,43%) пациентов – II степени, у 6 (8,57%) человек – III степени. Кровотечения различных локализаций были зарегистрированы у 3 (4,29%) человек. Особенности клинических проявлений ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии представлены в табл. 1.

Достоверные различия между клиническими проявлениями ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания по критерию Крускала – Уоллиса не выявлены ($p>0,05$).

Среди лабораторных показателей повышение уровня активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) отмечалось у 25 (35,71%) пациентов, АсАТ – у 34 (48,57 %) человек. Гипербилирубинемия имела место у 27 (38,57%) пациентов, снижение протромбинового индекса (ПТИ) – у 49 (70,0%) пациентов. Анемия различной степени тяжести обнаружена у 13 (18,57%) человек, повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) – у 38 (54,29%) человек. Оценка лабораторных параметров у пациентов с ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания представлена в табл. 2 и 3.

Таблица 1

Характеристика клинических проявлений у пациентов с ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания

Table 1

Characteristics of clinical manifestations in patients with Child – Pugh class A liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Клинический синдром	Алкогольный (1)		Вирусный (2)		Смешанный (3)		Другой (4)		χ^2	p
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Отсутствие жалоб	0	0	0	0	0	0	3	4,29	0,78	0,85
Геморрагический	0	0	1	1,43	0	0	2	2,86	3,48	0,32
Астеновегетативный	2	2,86	2	2,86	3	4,29	22	31,43	4,51	0,21
Диспепсический	3	4,29	1	1,43	2	2,86	26	37,14	1,92	0,58
Кожно-желтушный	0	0	1	1,43	0	0	9	12,86	1,78	0,62
Отечно-асцитический	4	5,71	3	4,29	2	2,86	40	57,14	0,34	0,92
Суставной	0	0	1	1,43	0	0	2	2,86	3,48	0,32
Варикоз расширенных вен пищевода	2	2,86	3	4,29	2	2,86	28	40,0	1,20	0,75
Кровотечения	0	0	0	0	1	1,43	2	2,86	0,67	0,08



Таблица 2
Параметры биохимического анализа крови у пациентов с ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 2
Parameters of biochemical blood tests in patients with Child – Pugh class A liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Me; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Общий белок, г/л	71,4; 68; 76,6	75; 71,3; 75,6	80,1; 78,4; 81,8	73,5; 67,3; 77,4	4,12	0,25
Альбумин, %	47,3; 47,3; 47,3	56,3; 55,4; 57,4	57,98; 52,75; 63,2	53,12; 45,9; 7,46	2,26	0,52
Общий билирубин, мкмоль/л	23,75; 16,6; 36,1	18,7; 11,2; 26,6	6,2; 5,4; 8,4	16,43; 10; 28,6	7,10	0,07
АсАТ, Ед/л	73,0; 56; 77	38; 36; 79	37; 23; 51	55; 32; 82	2,29	0,46
АлАТ, Ед/л	47; 36, 49	32; 21; 45	22; 22; 102	38,5; 26; 64	0,81	0,85
АсАТ/АлАТ	1,77; 1,10; 2,03	1,71; 0,81; 1,76	1,68; 1,05; 2,32	1,26; 0,92; 1,64	2,17	0,54
ГГТП, Ед/л	197,5; 161,5; 273,5	53; 36; 53	44; 23; 248	95; 53; 240	7,99	0,046
Креатинин, мкмоль/л	87,5; 70; 99	93; 84; 94,5	84; 66,5; 87,5	80,5; 66,5; 91	2,08	0,56
Мочевина, ммоль/л	5,85; 2,9; 6,4	4,2; 4; 4,8	4,3; 4,2; 5,4	5,6; 4,8; 6,9	4,31	0,23
ХС, ммоль/л	4,75; 3,95; 4,9	4; 3,2; 4,2	3,6; 3,3; 4,6	5,0; 4,4; 6,1	10,94	0,01
Протромбиновый индекс	0,83; 0,79; 0,89	0,84; 0,77; 0,92	0,82; 0,81; 1,1	0,89; 0,8; 0,97	1,89	0,59

Примечания: ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; ХС – холестерин.

Таблица 3
Параметры общего анализа крови у пациентов с ЦП класса А по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 3
Parameters of general blood tests in patients with Child – Pugh class A liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Me; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Лейкоциты	7,93; 5,93; 11,98	5,63; 5,07; 8,5	7,45; 2; 10,49	6,4; 4,9; 7,97	1,58	0,66
Эритроциты	4,56; 3,77; 5,26	4,17; 4,05; 4,84	3,52; 2,98; 6,03	4,23; 3,77; 4,77	0,38	0,94
Гемоглобин	143; 132; 162	136; 108; 137	98; 95; 182	135; 118; 147	1,19	0,75
Тромбоциты	210; 201; 230	178,2; 170; 221	159; 41; 337	172; 155; 215	2,66	0,45
СОЭ	21; 10; 35	10; 6; 18	15; 2; 64	12; 9; 27	1,95	0,58

Несмотря на наличие достоверных различий между группами по критерию Крускала – Уоллиса и тенденции к повышению медианы ГТТП у госпитализированных пациентов с алкогольным ЦП, апостериорное сравнение групп показало статистически значимые различия между группами 3 и 4 только по уровню ХС ($p=0,04$).

Среди пациентов с ЦП с классом тяжести В по Чайлду – Пью количество пациентов с алкогольной этиологией заболевания составило 23 (13,07%) человека, вирусной – 14 (7,95%) человек, другой – 128 (72,73%) и смешанной – 11 (6,25%) человек. Медиана возраста пациентов в 1-й группе находилась на уровне 51 ($q^{25}=41$; $q^{75}=60$) года, во 2-й группе – 55 ($q^{25}=46$; $q^{75}=61$) лет, в 3-й группе – 51 ($q^{25}=41$; $q^{75}=61$) года, в 4-й группе – 54,5 ($q^{25}=47,5$; $q^{75}=61$) года ($N=3,47$; $p=0,32$).

Клиническая картина заболевания в большинстве случаев проявлялась диспепсическим и астеновегетативными синдромами – у 124 (70,45%) и 121 (68,75%) человека соответственно. Отечно-асцитический синдром разной степени выраженности имел место у 62 (35,23%) человек. В меньшей степени отмечался кожно-желтушный синдром (55 человек, 31,25%). ВРВ имели место у 102 (57,95%) пациентов. Во всех случаях они локализовались в пищеводе. У 41 (23,29%) человека размер вен соответствовал I степени, у 38 (21,59%) пациентов – II степени, у 23 (13,01%) человек – III степени. Кровотечения различных локализаций были зарегистрированы у 27 (15,34%) человек. Особенности клинических проявлений ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания представлены в табл. 4.

Достоверные различия между клиническими проявлениями ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания по критерию Крускала – Уоллиса не выявлены ($p>0,05$).

Среди лабораторных показателей повышение уровня активности АЛАТ отмечено у 48 (27,27%) пациентов, АсАТ – у 119 (67,61 %) человек. Гипербилирубинемия зарегистрирована у 116 (65,91%) пациентов, ПТИ был снижен у 146 пациентов из 176 (82,95%). Анемия различной степени тяжести была обнаружена у 97 (55,11 %) человек, ускорение СОЭ – у 106 (60,23%) человек. Оценка лабораторных параметров

Таблица 4
Особенности клинических проявлений у пациентов с ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания

Table 4
Characteristics of clinical manifestations in patients with Child – Pugh class B liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Клинический синдром	Алкогольный (1)		Вирусный (2)		Смешанный (3)		Другой (4)		χ^2	p
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Отсутствие жалоб	1	0,58	1	0,58	0	0	2	1,17	2,33	0,51
Геморрагический	2	1,17	1	0,58	2	1,17	9	5,26	2,55	0,47
Астеновегетативный	15	8,77	9	5,26	6	3,51	91	53,22	0,95	0,81
Диспепсический	14	8,19	9	5,26	6	3,51	95	55,56	2,96	0,39
Кожно-желтушный	9	5,26	4	2,34	1	0,58	41	23,98	2,45	0,49
Отечно-асцитический	9	5,26	5	2,92	3	1,75	45	26,32	0,12	0,98
Суставной	1	0,58	0	0	0	0	4	2,34	0,89	0,83
Варикоз расширенных вен пищевода	10	5,68	8	4,55	10	5,68	74	42,05	6,89	0,08
Кровотечения	3	1,70	2	1,14	4	2,27	18	10,23	4,69	0,19



Таблица 5
Параметры биохимического анализа крови у пациентов с ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 5
Parameters of biochemical blood tests in patients with Child – Pugh class B liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Me; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Общий белок, г/л	69,4; 61,5; 74,1	68,8; 62; 74,2	71,75; 67; 76,5	69,55; 64,25; 75,9	2,31	0,51
Альбумин, %	48,4; 39,7; 52,97	47,7; 36,1; 55,45	41,1; 37,4; 41,7	48,1; 41; 52,18	4,29	0,23
Общий билирубин, мкмоль/л	63,55; 30,95; 86,55	18,8; 12,4; 36,4	19,55; 12,9; 44,16	38,8; 16,4; 63,3	11,51	0,009
АсАТ, Ед/л	83; 54; 156,5	103; 74; 125	51,25; 42; 93	61; 44; 98	8,26	0,04
АлАТ, Ед/л	38; 27; 81	60; 45; 95	35; 25,2; 56	31; 23; 48	10,60	0,01
АсАТ/АлАТ	2,15; 1,79; 3,15	1,51; 1,03; 1,77	1,69; 1,45; 1,92	1,94; 1,33; 2,59	9,98	0,02
ГГТП, Ед/л	307; 199; 507	79,5; 35; 113	91; 44; 167	151; 79; 275	15,56	0,001
Креатинин, мкмоль/л	77; 70; 87,5	87; 81; 91	78,75; 70; 87,5	77; 66,5; 87,5	6,57	0,09
Мочевина, ммоль/л	4,8; 3,7; 5,9	3,6; 3,1; 7,5	5,1; 3,9; 6,6	4,85; 3,55; 5,95	1,55	0,67
ХС, ммоль/л	4,35; 3,6; 6,1	3,2; 2,95; 4	3,4; 3,2; 3,7	4,4; 3,6; 5,9	10,36	0,02
ПТИ	0,69; 0,63; 0,78	0,81; 0,72; 0,84	0,74; 0,64; 0,85	0,74; 0,64; 0,86	2,17	0,54

Таблица 6
Параметры общего анализа крови у пациентов с ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 6
Parameters of general blood tests in patients with Child – Pugh class B liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Me; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Лейкоциты	8,33; 5,53; 13,1	3,81; 3; 6,43	5,3; 3,8; 10,2	6,1; 4,1; 8,7	8,08	0,04
Эритроциты	3,4; 2,51; 4,06	3,57; 3,22; 4,14	3,52; 3,21; 4,17	3,52; 3,07; 4,16	1,79	0,62
Гемоглобин	112; 94; 121	115; 103; 121	116; 107; 128	110; 97; 127	1,85	0,61
Тромбоциты	182; 123; 231	131,25; 113; 158	137; 88; 202	164; 118; 201	3,93	0,27
СОЭ	24; 15; 41	20; 11; 36	16,5; 15; 35	22; 10; 34	1,53	0,67

у пациентов с ЦП класса В по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания представлена в табл. 5 и 6.

В результате апостериорного сравнения групп были выявлены статистически значимые различия между группами 1 и 2 по параметру общего билирубина ($p=0,021$), коэффициенту де Ритиса ($p=0,02$), активности ГГТП ($p=0,001$) и лейкоцитов ($p=0,03$), между 1-й и 4-й группами – по параметру ГГТП ($p=0,03$), 2-й и 4-й группами – по показателю активности АлАТ ($p=0,01$) и ХС ($p=0,03$).

Среди пациентов с классом тяжести С по Чайлду – Пью количество пациентов с алкогольной этиологией ЦП составило 16 (18,39%) человек, вирусной – 10 (11,49%) человек, другой – 12 (13,79%) и смешанной – 49 (56,32%) пациентов соответственно. Медиана возраста пациентов в 1-й группе составила 42 ($q^{25}=38,5$; $q^{75}=57,5$) года, во 2-й группе – 50,5 ($q^{25}=44$; $q^{75}=63$) года, в 3-й группе – 41,5 ($q^{25}=36$; $q^{75}=62$) года, в 4-й группе – 58,0 ($q^{25}=50$; $q^{75}=62$) года ($N=9,08$; $p=0,03$). В результате апостериорного сравнения групп 1–4 методом Данна были выявлены статистически значимые различия по возрасту между группами 1 и 4 ($p=0,049$).

Клиническая картина в половине случаев проявлялась астеновегетативным синдромом (52 пациента, 59,77%). В меньшей степени отмечался отечно-асцитический, кожно-желтушный и диспепсический синдромы – у 38 (43,68%), 37 (42,53%) и 37 (42,53%) человек соответственно. У 37 (42,53%) человек отмечалась желтуха разной степени выраженности. ВРВ были выявлены у 57 (65,52%) пациентов. Во всех случаях они локализовались в пищеводе. У 11 (12,64%) человек размер вен соответствовал I степени, у 15 (17,24%) пациентов – II степени, у 31 (35,63%) человека – III степени. Кровотечения различных локализаций были зарегистрированы у 35 (40,23%) человек. Особенности клинических проявлений ЦП класса С по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания представлены в табл. 7.

В результате апостериорного сравнения групп установлено, что кожно-желтушный синдром по частоте встречаемости имел статистическую значимость между группами 1 и 2 ($\chi^2=8,6$; $p=0,003$), 2 и 4 ($\chi^2=8,26$; $p=0,004$).

Среди лабораторных показателей повышение уровня активности АлАТ выявлено у 30 (34,48%) пациентов, АсАТ – у 58 (66,67%) человек. Повышение уровня активности ГГТП обнаружено у 41 (47,13%) пациента. Гипербилирубинемия имела место

Таблица 7
Особенности клинических проявлений у пациентов с ЦП класса С по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 7
Characteristics of clinical manifestations in patients with Child – Pugh class C liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Клинический синдром	Алкогольный (1)		Вирусный (2)		Смешанный (3)		Другой (4)		χ^2	p
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Отсутствие жалоб	2	2,38	2	2,38	1	1,19	3	3,57	2,12	0,55
Геморрагический	3	3,57	4	4,76	3	3,57	10	11,9	2,43	0,49
Астеновегетативный	9	10,71	6	7,14	5	5,95	32	38,10	0,63	0,89
Диспепсический	8	9,52	4	4,76	1	1,19	24	28,57	7,75	0,05
Кожно-желтушный	9	10,71	0	0	4	4,76	24	28,57	9,32	0,03
Отечно-асцитический	6	7,14	2	2,38	5	5,95	25	29,76	4,01	0,26
Суставной	1	1,19	0	0	0	0	1	1,19	1,52	0,68



у 74 (85,06%) человек, пониженный уровень ПТИ – у 77 (88,51 %) пациентов. Анемия различной степени тяжести была установлена у 62 (71,26%) человек, ускорение СОЭ – у 36 (41,38%) пациентов. Оценка лабораторных параметров у пациентов с ЦП класса С по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания представлена в табл. 8 и 9.

В результате апостериорного сравнения групп были выявлены статистически значимые различия между группами 1 и 2 по параметру общего билирубина ($p=0,03$), АсАТ ($p=0,002$), группами 2 и 4 – по параметру АсАТ ($p=0,02$).

Таким образом, ни клинические, ни лабораторные проявления ЦП на начальных этапах его развития (класс А по Чайлду – Пью) не позволяют дифференцировать заболевание по этиологии. При достижении развернутой стадии (стадия В по Чайлду – Пью) при алкогольном ЦП в крови проявляются характерные для него лабораторные изменения в виде более высоких значений лейкоцитов, общего билирубина, активности ГГТП и коэффициента де Ритиса, что позволяет отличить его от ЦП вирусной этиологии. На терминальной стадии (стадия С по Чайлду – Пью) дифференциация возможна не только по более значительной гипербилирубинемии, но уже и по клинической картине, для которой при алкогольном ЦП в отличие от вирусной этиологии более характерен кожно-желтушный синдром. Предположительно,

Таблица 8
Параметры биохимического анализа крови у пациентов с ЦП класса С по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания

Table 8
Parameters of biochemical blood tests in patients with Child – Pugh class C liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Ме; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Общий белок, г/л	64,9; 57; 74,4	51,5; 48; 60,8	63,6; 60; 74,4	65,8; 61,6; 73	4,96	0,18
Альбумин, %	38,55; 33,9; 42,9	42,5 42,5; 43,1	43,83; 43,83; 43,83	40,6; 37,02; 46,55	–	1,0
Общий билирубин, мкмоль/л	209,7; 56,9; 424,8	46,3; 22,5; 72,6	47,9; 12,6; 169,6	86,05; 53,2; 247,85	11,25	0,01
АсАТ, Ед/л	110; 84; 176	32; 29; 40	69; 52; 254	89,5; 61; 128	12,86	0,005
АлАТ, Ед/л	41; 37; 88	22; 17; 33,5	44; 33; 72	36; 23; 61	5,69	0,13
АсАТ/АлАТ	2,27; 1,79; 2,98	1,54; 1,37; 1,94	1,87; 1,44; 2,74	2,06; 1,79; 2,92	6,01	0,11
ГГТП, Ед/л	105; 50; 211	91; 32; 148	175; 131; 515	195; 110; 267	3,85	0,28
Креатинин, мкмоль/л	94,5; 68; 234	139; 126; 249	115,5; 97; 374	87,5; 73; 118	7,28	0,06
Мочевина, ммоль/л	7,9; 3,6; 18,5	15,4; 9,7; 24,5	7,4; 4,4; 31,7	6,4; 5; 9,56	7,29	0,06
ХС, ммоль/л	2,65; 2,3; 5,2	2,97; 1,5; 4,44	3,4; 2,4; 4,4	3,8; 2,7; 5	1,76	0,62
ПТИ	0,57; 0,49; 0,62	0,71; 0,7; 0,86	0,65; 0,52; 0,71	0,65; 0,58; 0,76	6,51	0,09

Таблица 9
Параметры общего анализа крови у пациентов с ЦП класса С по Чайлду – Пью в зависимости от этиологии заболевания
Table 9
Parameters of general blood tests in patients with Child – Pugh class C liver cirrhosis depending on the etiology of the disease

Показатель	Алкогольный (1)	Вирусный (2)	Смешанный (3)	Другой (4)	Н	р
	Me; q ²⁵ ; q ⁷⁵					
Лейкоциты	11,2; 5,7; 16,2	12,3; 10,1; 2,9	5,58; 4,2; 14,1	8,85; 6,63; 12,88	3,09	0,38
Эритроциты	2,82; 2,32; 3,4	2,84; 2,78; 3,38	2,88; 2,8; 3,74	3,1; 2,51; 3,59	1,45	0,69
Гемоглобин	91,5; 90; 112	93; 86; 95	96; 80; 100	102; 91; 116	5,49	0,14
Тромбоциты	172; 86; 203	94; 77; 126	79,5; 52; 135	151; 99; 193	6,61	0,09
СОЭ	26; 7; 45	5; 3; 10	19; 5; 25	17,5; 59; 82	8,16	0,04

гипербилирубинемия и кожно-желтушный синдром при алкогольной этиологии заболевания обусловлены присоединением в ряде случаев к ЦП желтушной формы острого алкогольного гепатита, который в качестве отдельной нозологической формы выделяется крайне редко. В то же время можно предположить, что часть пациентов с алкогольной болезнью печени в связи с этическими проблемами верификации диагноза попадает в группу ЦП другой этиологии и, как следствие, приводит к похожим различиям этой группы по сравнению с вирусным поражением печени. Более высокие уровни концентрации ХС при ЦП другой этиологии являются в ряде случаев проявлением неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), которая также может приводить к развитию ЦП – как самостоятельно, так и утяжеляя течение заболеваний печени другой этиологии.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ни клинические, ни лабораторные проявления ЦП на начальных этапах его развития (класс А по Чайлду – Пью) не позволяют дифференцировать заболевание по этиологии. При достижении развернутой стадии (стадия В по Чайлду – Пью) при алкогольном ЦП, в отличие от вирусного, в образцах крови отмечены более высокие показатели содержания лейкоцитов ($p=0,03$), общего билирубина ($p=0,021$), активности ГГТП ($p=0,001$) и коэффициента де Ритиса ($p=0,02$). При другой этиологии ЦП, в отличие от алкогольного, характерен более низкий уровень активности ГГТП ($p=0,001$), а в отличие от вирусного – более низкие значения активности АлАТ ($p=0,01$) и высокие показатели концентрации ХС ($p=0,03$). На терминальной стадии (стадия С по Чайлду – Пью) дифференциация возможна уже по клинической картине, для которой для вирусного ЦП, в отличие от алкогольной и другой этиологии, менее характерен кожно-желтушный синдром ($p=0,003$ и $p=0,004$ соответственно). На этой стадии у вирусного ЦП, в отличие от алкогольной и другой этиологии, имеют место более низкие уровни активности АсАТ и билирубина ($p=0,02$ и $p=0,002$ соответственно).



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sennikova A., Krasavtsev E., Mikhailova E. Clinical and laboratory manifestations of liver cirrhosis. Proceedings of the 10th Republican Scientific-Practical Conference; 2020 December 4; Gomel: GomGMU. 2020:136–138. Available at: <https://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/7524>. (in Russian)
2. Morgunov L. Diabetes mellitus in patients with liver cirrhosis: new treatment options. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2017;4(3):75–85. Available at: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2017-4-3-7>. (in Russian)
3. Svetova E., Sapronova N., Katelnitsky I. Opportunities of care for patients with cirrhosis complicated by portal hypertension (literature review). *Medical Bulletin of the South of Russia*. 2018;9(1):6–16. Available at: <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2018-9-1-6-16>. (in Russian)
4. Osipov B. Transplantation of mesenchymal stem cells in combination with ozone therapy in the treatment of experimental liver cirrhosis. *Bulletin of Vitebsk State Medical University*. 2018;17:81–90. Available at: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2018.1.81>. (in Russian)
5. Mironenko Ye. Peculiarities of clinical and laboratory parameters in patients with liver cirrhosis. *Collected scientific articles. XII Resp. scientific-practical conf.; 2021; Gomel: GomSMU*. 2021;8:126–129. Available at: <http://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/8987>. (in Russian)
6. On approval of the clinical protocol "Diagnosis and treatment of patients with diseases of the digestive organs" [electronic resource]: resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus. 2017;54. Ministry of Health of the Republic of Belarus. Available at: http://minzdrav.gov.by/upload/dadfiles/001077_838640_54gastro.pdf. (in Russian)



Гриневич Т.Н.✉, Кот М.О., Бах М.С., Островская К.А.
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Клинико-лабораторные проявления новой коронавирусной инфекции COVID-19 у беременных в периоде их госпитализации в лечебно-профилактическое учреждение

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Гриневич Т.Н. – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка данных, написание текста; Кот М.О. – обзор литературы, написание текста; Бах М.С. – сбор и обработка материала, обзор литературы; Островская К.А. – сбор и обработка материала, обзор литературы.

Подана: 31.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: tgrinevich@yandex.by

Резюме

Введение. С ростом заболеваемости COVID-19 увеличивается число случаев данной инфекции у беременных женщин. При развитии инфекции происходят изменения некоторых лабораторных (невирусологических) показателей крови. Выраженность изменений этих показателей тесно взаимосвязана с тяжестью течения инфекции.

Цель. Провести сравнительный анализ клинико-лабораторных данных течения беременности у пациенток с коронавирусной инфекцией нового типа SARS-CoV-2.

Материалы и методы. В исследование включены 132 беременные женщины: 91 с диагнозом «вирусная инфекция SARS-CoV-2» и 41 женщина без диагноза коронавирусной инфекции. Биохимические исследования проводили на анализаторе Beckman Coulter AU 5800 (США), гематологические – Sysmex XS-500i (Япония), гемостазиологические – Helena AC-4 (Великобритания).

Результаты. У беременных с диагнозом COVID-19 уровень общего билирубина ($p=0,011$), сывороточного магния ($p=0,06$), фибриногена ($p=0,016$); протромбиновое время по Квику ($p=0,009$); количество лейкоцитов ($p=0,03$), доля палочкоядерных нейтрофилов ($p=0,02$) и показатель RDW ($p<0,02$) были достоверно выше, а уровень хлорид-ионов ($p=0,009$), МСНС ($p=0,02$) и МНО ($p=0,001$) достоверно ниже, чем у беременных без коронавирусной инфекции. У 28,6% беременных с SARS-CoV-2 наблюдался повышенный уровень СРБ и широкий разброс показателей концентрации ферритина. Уровень печеночных трансфераз был повышен в 15,5% (АСТ) и 8,4% (АЛТ) случаев, гипокальциемия наблюдалась у 75% беременных с коронавирусной инфекцией. У беременных с клиническими проявлениями COVID-19 показатели АЧВТ ($p=0,008$) и R ($p=0,003$) были достоверно ниже, чем у женщин с бессимптомным течением инфекции. Нейтрофилез достоверно чаще выявлялся у беременных без клинических признаков инфекции COVID-19 ($p=0,04$).

Заключение. Выявленные изменения свидетельствуют о необходимости периодического наблюдения за беременными и мониторинга лабораторных показателей, которые могут служить объективным основанием для предупреждения в дальнейшем



развития сопутствующей патологии, способствовать раннему началу терапии, а также иметь прогностическое значение при инфекции COVID-19.

Ключевые слова: беременные, COVID-19, биохимия, гематология, гемостаз

Tatiana N. Grinevich✉, Maksim O. Kot, Maria S. Bakh, Ksenia A. Ostrovskaya
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Clinical and Laboratory Manifestations of the New Coronavirus Infection COVID-19 in Pregnant Women during Their Hospitalization in the Medical Institution

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tatiana N. Grinevich – study concept and design, statistical data processing, text writing; Maksim O. Kot – literature review, text writing; Maria S. Bakh – material collection and processing, literature review; Ksenia A. Ostrovskaya – material collection and processing, literature review.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: tgrinevich@yandex.by

Abstract

Introduction. The incidence of COVID-19 is increasing and the number of cases of this infection is increasing in pregnant women. Changes in some laboratory (non-virological) blood parameters occur with the development of infection. The severity of changes in these indicators is closely related to the severity of the infection.

Purpose. To conduct a comparative analysis of clinical and laboratory data on the course of pregnancy in patients with a new type of coronavirus infection SARS-CoV-2.

Materials and methods. The study included 132 pregnant women: 91 with diagnosed "SARS-CoV-2 virus infection" and 41 women without coronavirus infection. Biochemical studies were performed on a Beckman Coulter AU 5800 analyzer (USA), hematological – Sysmex XS-500i (Japan), hemostasiological – Helena AC-4 (Great Britain).

Results. In pregnant women diagnosed with COVID-19, the level of total bilirubin ($p=0.011$), serum magnesium ($p=0.06$), fibrinogen ($p=0.016$); Prothrombin Time Quick ($p=0.009$); the number of leukocytes ($p=0.03$), the proportion of stab neutrophils ($p=0.02$) and the RDW index ($p<0.02$) were significantly higher, and the chlorine level ($p=0.009$), MCHC ($p=0.02$) and INR ($p=0.001$) are significantly lower than in pregnant women without coronavirus infection. In 28.6% of pregnant women with SARS-CoV-2 elevated CRP and a wide range of ferritin were observed. The level of hepatic transferases was increased in 15.5% (AST) and 8.4% (ALT) of cases, hypocalcemia was observed in 75% of pregnant women with coronavirus infection. In pregnant women with clinical manifestations of COVID-19, the activated partial thromboplastin time, APTT ($p=0.008$) and R ($p=0.003$) values were significantly lower than in women with asymptomatic infection. Neutrophilia was significantly more frequently detected in pregnant women without clinical signs of COVID-19 infection ($p=0.04$).

Conclusion. The identified changes indicate the need for periodic monitoring of pregnant women and monitoring of laboratory parameters, which can help further prevent

the development of comorbidities, promote early initiation of therapy, and also have prognostic value in COVID-19 infection.

Keywords: pregnant women, COVID-19, biochemistry, hematology, hemostasis

■ ВВЕДЕНИЕ

В марте 2020 года ВОЗ объявила пандемию COVID-19 – заболевания, связанного с новым коронавирусом, получившего название тяжелого острого респираторного синдрома коронавируса-2 (SARS-CoV-2). У пациентов с COVID-19 развивается тяжелая интерстициальная пневмония, которая может закончиться острым респираторным дистресс-синдромом и синдромом системного воспалительного ответа [1]. С ростом заболеваемости COVID-19 возросло количество случаев данной инфекции у беременных. При беременности женщин с COVID-19 иммунитет, защищающий плод от рисков случайной атаки со стороны иммунной системы матери, ослабевает. Поэтому беременные становятся более восприимчивы к патогенным микроорганизмам и простудным инфекционным заболеваниям.

Лабораторная медицина вносит немаловажный вклад в диагностику и в процесс принятия клинических решений при многих инфекционных заболеваниях, включая COVID-19. И хотя биохимический анализ крови не дает какой-либо специфической информации, но обнаруживаемые отклонения могут указывать на наличие органической дисфункции, сопутствующих заболеваний и/или развитие осложнений. Согласно проведенным исследованиям, при COVID-19 прогностически значимыми являются отклонения от нормальных значений следующих показателей: повышение активности аминотрансфераз и креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, концентрации тропонина, креатинина, мочевины, СРБ и фибриногена [2, 3]. Электролитный дисбаланс не редкость при коронавирусной инфекции. Так, по данным Tezcan et al., у 53% из 408 лиц, инфицированных COVID-19, были выявлены электролитные нарушения: гипонатриемия (35,8%), гипокальциемия (9,5%), гипокалиемия (6,8%), гипохлоремия (6,8%) и гиперкалиемия (1,7%) [4].

Выраженность изменений гематологических показателей тесно взаимосвязана с тяжестью течения инфекции. SARS-CoV-2 непосредственно поражает лимфоциты, которые являются основным иммунным барьером против различных вирусных инфекций. При коронавирусной инфекции происходит высвобождение хемокинов и провоспалительных цитокинов. Они, в свою очередь, «вытягивают» моноциты и Т-лимфоциты из крови в инфицированную область, поэтому у пациентов с COVID-19 возникает лимфопения [5]. Другими, менее распространенными негативными прогностическими маркерами являются нейтрофилез и тромбоцитопения [6].

Изменения системы гемостаза во время физиологической беременности характеризуются прокоагулянтным дисбалансом, который защищает женщин от кровотечения, но увеличивает риск венозной тромбоэмболии. Сопутствующие гипервоспаление и коагулопатия у пациенток с COVID-19, в свою очередь, сопровождаются широким изменением различных параметров гемостаза в сторону активации, включая D-димер, протромбиновое время (ПВ) по Квику, изменение концентрации фибриногена и тромбоцитопению [6]. Причем одним из наиболее потенциальных прогностических маркеров тяжести болезни и/или смертности у пациентов с данной патологией является повышенный уровень D-димеров [7].



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сравнительный анализ клинико-лабораторных данных течения беременности у пациенток с коронавирусной инфекцией нового типа SARS-CoV-2.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего исследованы 132 беременные, проходившие стационарное лечение на базе УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи города Гродно»: из них 91 пациентка с диагнозом «вирусная инфекция SARS-CoV-2» составила основную группу и 41 беременная женщина без коронавирусной инфекции – контрольную группу.

Женщины исследуемых групп были сопоставимы по возрасту и сроку беременности. Возраст беременных опытной группы составил от 19 до 40 лет, медиана (Me) – 29 лет, нижняя квартиль (Q25) – 25 лет, верхняя квартиль (Q75) – 32 года, срок беременности от 35 до 287 дней (Me – 259, Q25 – 124, Q75 – 274). Критериями включения были репродуктивный возраст, положительные результаты ПЦР на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 в назофарингеальном мазке или/и выявление в крови иммуноглобулинов класса М против антигенов вируса SARS-CoV-2, а также наличие информированного согласия на проведение исследования.

Возраст обследуемых контрольной группы составил от 17 до 40 лет, медиана (Me) – 30 лет, нижняя квартиль (Q25) – 27 лет, верхняя квартиль (Q75) – 34 года, срок беременности от 28 до 284 дней (Me – 267, Q25 – 238, Q75 – 273). Критериями включения были: репродуктивный возраст, отрицательные результаты ПЦР на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 в назофарингеальном мазке или/и выявление в крови иммуноглобулинов класса М против антигенов вируса SARS-CoV-2, а также наличие информированного согласия на проведение исследования.

Клиническое обследование женщин основной группы и контрольной группы включало детальное изучение соматического, акушерского (количество беременностей и родов, число живых детей, наличие осложнений предыдущих и текущей беременности, родов и т. д.), гинекологического и семейного анамнеза. Антропометрическое обследование женщин включало измерение массы и длины тела. Расчет индекса массы тела (ИМТ) проводился по следующей формуле: масса (кг) / рост (м²). Особое внимание уделялось выявлению клинических проявлений острой респираторной коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

Широкий спектр биохимических исследований выполнялся на анализаторе Beckman Coulter AU 5800 (США). Гематологические исследования проводились с помощью высокотехнологического гематологического анализатора Sysmex XS-500i (Япония). Исследование системы гемостаза осуществлялось с помощью современного гемостазиологического анализатора Helena AC-4 с использованием коммерческих наборов Helena Biosciences Europe (производитель Великобритания). Коагулологический анализ включал измерение протромбинового времени по Квику, МНО, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), уровня фибриногена и D-димеров. Интерпретация полученных результатов проводилась согласно срокам гестации.

Диагностика COVID-19 проводилась на основе детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР или ОТ-ПЦР). Исследование антител IgM и IgG

к коронавирусу SARS-CoV-2 выполнялось методом иммунохроматографического анализа в сыворотке с использованием тест-системы Shanghai ZJ Bio-Tech Co Ltd (China).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Результаты статистической обработки представлены в виде величины верхней (Q75) и нижней (Q25) квартилей и медианы (Me) – Me (Q25–Q75), количества наблюдений (n), частоты встречаемости (%). Связь между переменными оценивали с помощью корреляционного анализа (по методу Spearman), сравнение двух независимых групп изучаемой переменной проводили с помощью теста Манна – Уитни (U).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастная характеристика, распределение по триместрам беременности, антропометрические данные и структура акушерской патологии беременных основной и контрольной групп представлены в табл. 1.

Индекс массы тела в обеих группах значимо не отличался и составил в основной группе 27,87 (23,74–31,98), в контрольной – 26,99 (24,85–28,98). Прегестационная оценка индекса массы тела в основной группе показала, что 36,47% женщин имели нормальную массу тела, у 27,3% женщин наблюдался избыточный вес и 18,2% беременных страдали ожирением (из них 3,6% женщин имели ожирение 2-й степени). В контрольной группе 28,1% женщин до беременности имели нормальную массу тела, 56,3% – избыточную и 18,6% женщин страдали ожирением 1-й степени. Профессиональных вредностей и вредных привычек ни одна из женщин обеих групп не отмечала. Количество первородящих пациенток оказалось достоверно больше в группе с женщин с инфекцией COVID-19 по сравнению с контрольной группой.

У большинства пациенток с COVID-19 был отягощенный соматический и акушерско-гинекологический анамнез. Структура экстрагенитальной патологии у беременных основной и контрольной групп представлена в табл. 2.

Таблица 1
Акушерская характеристика представительниц основной и контрольной групп
Table 1
Obstetric characteristics of the representatives of the main and control groups

Параметр	Основная группа	Контрольная группа
Возраст	29 (25–32)	30 (27–34)
Распределение по триместрам беременности		
I триместр	17 (18,68)	3 (7,31)
II триместр	13 (14,29)	3 (7,31)
III триместр	61 (67,03)	35 (85,38)
ИМТ	27,87 (23,74–31,98)	26,99 (24,85–28,98)
Число родов в анамнезе		
0	44 (48,35)	9 (21,95)
1	28 (30,77)	17 (41,46)
2	14 (15,38)	10 (24,39)
3 и более детей	5 (5,49)	5 (12,20)
Выкидыш / неразвивающаяся беременность в анамнезе	16 (17,58)	6 (14,63)



Таблица 2
Экстрагенитальная патология у беременных с COVID-19 и женщин без диагноза COVID-19
Table 2
Extragenital pathology in pregnant women with COVID-19 and women without a diagnosis of COVID-19

Патология	Основная группа	Контрольная группа
Нет	39 (42,86)	14 (34,15)
Патология дыхательной системы	18 (19,78)	2 (4,87)
Сахарный диабет	10 (10,99)	2 (4,87)
Заболевания сердечно-сосудистой системы	8 (8,79)	5 (12,2)
Патология щитовидной железы	6 (6,59)	5 (12,2)
Заболевания печени	1 (1,09)	0
Заболевания почек	16 (17,58)	7 (17,07)
Заболевания желудочно-кишечного тракта	11 (12,09)	5 (12,2)

Чаще всего у беременных с COVID-19 встречались хронический тонзиллит, метаболический синдром, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, хронические инфекции мочевыводящих путей и хронические заболевания желудочно-кишечного тракта. Неотягощенный соматический анамнез встречался у 42,86% пациенток основной группы.

Среди заболеваний дыхательной системы у беременных с диагнозом COVID-19 чаще преобладал хронический тонзиллит – у 13 (14,29%) женщин, хронический гайморит наблюдался у 2,2% женщин, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и хронический ринит встречались в 1,1% случаев каждый. Патология щитовидной железы чаще была представлена гипотиреозом (4,4%), узловым (1,1%) и диффузным зобом (1,1%). Заболевания желудочно-кишечного тракта были представлены следующими нозологическими формами: хронический гастрит (4,4%), хронический дуоденит (2,2%), язва желудка и двенадцатиперстной кишки – 1,1%. Среди сердечно-сосудистой патологии чаще встречались артериальная гипертензия (в 7,7% случаев). Проплап митрального клапана выявлен в 1,1% случаев. Заболевания мочевыводящей системы представлены в основном патологией воспалительного характера: хронический пиелонефрит (6,6%), хронический гломерулонефрит (4,4%) и хронический цистит (1,1%).

В контрольной группе преобладали заболевания мочевыводящей (17,01%), сердечно-сосудистой (12,2%) и эндокринной системы (12,2%). Неотягощенный соматический анамнез встречался у 34,15% пациенток контрольной группы. Все женщины в обеих группах на момент обследования находились в синдромальной ремиссии эндогенного заболевания.

Анализ акушерского анамнеза позволил выявить высокую частоту осложнений предыдущих беременностей у женщин с инфекцией COVID-19 (19,78% беременных), их них: 9,89% приходилось на долю самопроизвольных выкидышей в I и II триместрах гестации, в 8,79% наблюдений в анамнезе женщин основной группы установлены случаи неразвивающейся беременности и 1,1% – случаи внематочной беременности. В контрольной группе выкидыши и случаи замершей беременности установлены у 14,63% женщин (9,76% и 4,87% соответственно). Искусственный аборт отмечен у 8,79% пациенток основной группы и у 7,32% женщин контрольной группы.

Из перенесенных гинекологических заболеваний женщины основной группы отмечали неспецифический кольпит и цервицит (14,9%), сальпингоофорит (12,1%), эрозию шейки матки (17,5%), кисту яичников (12,6%) и эндометрит (7,8%).

Наиболее частым осложнением настоящей беременности у женщин основной группы были угроза ее прерывания (41,76%), угрожающие преждевременные роды (15,68%), а также плацентарные нарушения (3,3%). В контрольной группе чаще наблюдались угроза прерывания (29,27%) и плацентарные нарушения (7,32%).

Бессимптомное течение COVID-19 зарегистрировано у большинства (68,13%; 62/91) пациенток опытной группы. Остальная часть беременных основной группы (31,87%; 29/91) перенесли коронавирусную инфекцию в легкой форме. Основными клиническими проявлениями вирусной инфекции SARS-CoV-2 в основной группе были гипертермия (41,7%), кашель (74,4%) и потеря обоняния (21,4%). Общую слабость отмечали 7 беременных (24,14%), заложенность носа или насморк – 5 человек (17,24%), диспепсические явления – 4 человека (13,79%), на головную боль предъявляли жалобы только две женщины (6,9%). По данным компьютерной томографии в большинстве случаев (95,6%) характерные признаки вирусной пневмонии у них отсутствовали и только у 4 женщин выявлено усиление легочного рисунка.

Анализ данных биохимического исследования при поступлении в стационар беременных основной и контрольной групп показал отсутствие статистически значимых различий при сравнении средних значений измеренных параметров у пациенток, кроме показателя общего билирубина (табл. 3).

Таблица 3
Данные биохимических исследований в основной и контрольной группах
Table 3
Data of biochemical studies in the main and control groups

Параметр	Основная группа	Контрольная группа	p
Общий белок, г/л	62 (59–66)	62 (60–65)	–
Мочевина, ммоль/л	3,2 (2,7–3,8)	3,05 (2,7–3,6)	–
Глюкоза, ммоль/л	4,34 (3,7–4,84)	4,3 (4–4,7)	–
Лактат, ммоль/л	1,06 (0,91–1,48)	1,1 (0,85–1,41)	–
Креатинин, мкмоль/л	58 (50–68)	59 (56–71)	–
Общий билирубин, мкмоль/л	11 (9,3–14,5)	10,2 (8,9–11)	0,011
Прямой билирубин, мкмоль/л	5,35±1,06	5,01±0,96	–
АСТ, ЕД/л	25 (21–30)	26 (23–28)	–
АЛТ, ЕД/л	17 (14–28)	17 (14–23)	–
ЛДГ, ЕД/л	449 (340–478)	426 (311–428)	–
СРБ, мг/л	17,0 (0–21,0)	8,10 (0–70,5)	–
Ферритин, нг/л	16,8 (9,7–27,9)	74,7 (10–80,9)	–
Са, ммоль/л	2,2 (2,06–2,24)	2,11 (2,07–2,21)	–
Na, ммоль/л	140,2 (138,9–141,9)	141,7 (139–142,9)	–
K, ммоль/л	4,24 (4,05–4,5)	4,4 (4,05–4,74)	–
Cl, ммоль/л	103,6 (100,6–105,4)	105,7 (102–108,5)	0,009
Mg, ммоль/л	0,81 (0,77–0,99)	0,76 (0,67–0,77)	0,046
Железо, ммоль/л	15,6 (9,7–38,0)	14,9 (7–16,5)	–
ОЖСС, ммоль/л	77,7 (72–91,8)	80,8 (45–99)	–

Примечания: ЛДГ – лактатдегидрогеназа; АСТ – аспартатаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза; СРБ – С-реактивный белок.



Установлено, что уровень общего билирубина был достоверно выше ($p=0,011$) у беременных с инфекцией SARS-CoV-2, чем в группе беременных без диагноза COVID-19. Следует отметить, что уровень билирубина в обеих группах не выходил за пределы референсных значений. Однако данные последних исследований демонстрируют, что показатель общего билирубина считается одним из главных лабораторных маркеров повреждения печени у пациентов с COVID-19, в особенности при прогрессировании и тяжести инфекционного процесса [8]. Повреждение печени при COVID-19 может быть обусловлено как прямым вирусным повреждением гепатоцитов и холангиоцитов, так и результатом системной воспалительной реакции, цитокиновой агрессией или лекарственной токсичностью [9].

Согласно другим параметрам, отражающим печеночный профиль (АСТ и АЛТ), достоверных различий между опытной и контрольной группами не обнаружено. Тем не менее, у 14 (15,6%) беременных с COVID-19 наблюдался умеренно повышенный уровень АСТ и в 8,9% случаев – умеренное повышение АЛТ, что является признаком цитолитического процесса. По данным литературы, активность трансаминаз при инфекции COVID-19 повышалась у 14–53% пациентов [10]. Как правило, повышение активности АЛТ/АСТ не превышало 1,5–2 норм от верхней границы нормы. При этом повышенный уровень АЛТ и АСТ у пациентов с инфекцией SARS-CoV-2 отмечался уже на ранних стадиях заболевания [11].

В отдельности следует отметить, что у 28,6% беременных с COVID-19 отмечалось увеличение СРБ в диапазоне 10–169 мг/л, являющегося неспецифическим и высокочувствительным маркером острого воспаления. Уровень данного биохимического маркера коррелирует с тяжестью состояния пациентов, распространенностью воспалительного процесса и неблагоприятным исходом COVID-19 [12, 13].

Несмотря на то, что уровень ферритина у женщин с инфекцией COVID-19 в большинстве случаев не выходил за референсные пределы, наблюдался широкий разброс данного показателя (от 15,8 до 1264,3 мкг/л). Ферритин является информативным маркером-индикатором острофазовой реакции воспаления, увеличение его концентрации наряду с другими маркерами воспаления отмечается при неблагоприятном течении данного заболевания [13, 14].

В ходе исследования электролитного состава сыворотки крови и минерального обмена основная и контрольная группы различались по уровню сывороточного магния и хлора (табл. 3). Так, уровень магния был выше в группе беременных с подтвержденным диагнозом COVID-19, чем в группе беременных без инфекции ($p=0,046$). Магний считается одним из основных адаптогенных факторов в организме человека. Так, магнийсодержащие ферменты, а также свободные ионы Mg^{2+} , помимо участия в различных энергетических и пластических процессах, играют значительную роль при передаче нервных импульсов, синтезе АТФ, метаболизме простагландинов, окислении жирных кислот, принимают участие в регуляции осмотического равновесия, обмене катехоламинов и других нейротрансмиттеров. Физиологическая беременность сопровождается значительным снижением уровня магния (в 2–3 раза по сравнению с таковым у небеременной женщины) как в сыворотке крови, так в тканях в связи с широким его использованием в пластических и энергетических процессах [15]. Можно допустить, что повышение уровня магния является результатом активации системы противовирусной защиты организма (в том числе против нового вируса SARS-CoV-2).

Другой особенностью минерального обмена при физиологической беременности является задержка в организме солей натрия, калия, хлоридов. В выполненном исследовании установлено достоверное снижение уровня хлорид-ионов сыворотки крови беременных с подтвержденным COVID-19 относительно контрольной группы ($p=0,009$). Хлорид-ионы играют большую роль в процессах передачи нервного импульса, в синаптической передаче и в образовании соляной кислоты желудочного сока. Учитывая, что ионы хлора и натрия являются осмотически активными веществами, в связи с падением уровня осмолярности (вследствие увеличения объема циркулирующей крови) наблюдается тенденция к снижению уровня этих электролитов. Другая возможная причина гипохлоремии – перераспределение хлора из крови в ткани, например, в условиях ацидоза.

Отдельно стоит отметить, что статистических отличий в исследуемых группах по сывороточному кальцию не выявлено, однако гипокальциемия в выполненном исследовании наблюдалась у 46 (55,1%) беременных с диагнозом COVID-19. Уровень кальция практически не меняется при физиологической беременности. Кальций необходим для мышечного сокращения, синаптической передачи нервного импульса и является одним из факторов свертывающей системы крови. В ряде исследований показано, что при коронавирусной инфекции гипокальциемия отмечается у 62–82% пациентов при поступлении в стационар и ассоциирована с более тяжелым течением заболевания [16]. Наблюдающаяся у беременных гипокальциемия может быть связана как с нарушением канальцевого транспорта кальция, так и со снижением функциональной активности нефронов почек [17].

Результаты гематологического обследования беременных в исследуемых группах представлены в табл. 4.

Таблица 4
Гематологические показатели женщин основной (с инфекцией COVID-19) и контрольной (без инфекции COVID-19) групп
Table 4
Hematological parameters of the main (with COVID-19 infection) and control (without COVID-19 infection) groups

Показатели	Основная группа	Контрольная группа	p
RBC, $10^{12}/л$	4,1 (3,7–4,3)	3,9 (3,6–4,1)	–
Hb, г/л	116 (102–124)	115 (109–119)	–
Ht	36,9 (34–39)	36,1 (33,8–37,1)	–
MCV	92,7 (88,6–95,2)	92,7 (88,4–95)	–
MCH	29,1 (27,1–30,4)	29,9 (28,6–30,8)	–
MCHC	311 (306–325)	319 (315–326)	0,02
RDW	14,2 (13–15,5)	13 (12,7–14)	0,02
PLT, $10^9/л$	213 (187–255)	213 (185–278)	–
WBC, $10^9/л$	10,8 (7,6–13,2)	7,1 (6,6–9,1)	0,03
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4 (3–6)	3 (2–4)	0,02
Сегментоядерные нейтрофилы, %	69,5 (61–74)	67 (61–72)	–
Лимфоциты, %	19,5 (15–23)	24 (17–26)	–
Моноциты, %	5 (3–7)	5 (3–6)	–
Эозинофилы, %	1 (0–2)	1 (1–2)	–
СОЭ, мм/час	27 (22–36)	29,5 (24–39)	–



Медианы показателей общего анализа крови в опытной и контрольной группах не выходили за пределы референсных значений. Однако в группе беременных с подтвержденным COVID-19 количество лейкоцитов ($p=0,03$) и процент палочкоядерных нейтрофилов были достоверно выше ($p=0,02$), чем в контрольной группе. Также в группе беременных с подтвержденным диагнозом COVID-19 оказался достоверно ниже ($p=0,02$) показатель средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (MCHC) и выше ($p=0,02$) – показатель анизоцитоза (RDW). Лейкоцитоз с увеличением количества молодых нейтрофилов свидетельствует об остром инфекционном процессе, а снижение показателя MCHC говорит о нарушении синтеза гемоглобина вследствие недостаточной эритропоэтической реакции костного мозга на воспалительный процесс.

Анемия легкой степени тяжести выявлена у 13,5% беременных с COVID-19, небольшой лейкоцитоз обнаружен у 28,4% женщин, тромбоцитопения – у 4,1% пациенток опытной группы. В 27,0% случаев у женщин с диагнозом «вирусная инфекция SARS-CoV-2» наблюдалась ускоренная СОЭ. В группе беременных без диагноза COVID-19 анемия легкой степени тяжести выявлена у 12,5% беременных, небольшой лейкоцитоз обнаружен у 15,0%, тромбоцитопения – у 47,5% пациенток, в 22,5% случаев наблюдалась ускоренная СОЭ.

Относительная лимфоцитопения от 5% до 18% наблюдалась у 29,7% пациенток с коронавирусной инфекцией и у 25% женщин контрольной группы. Абсолютная лимфоцитопения (количество лимфоцитов $<0,98 \times 10^9/\text{л}$) выявлена только у беременных группы с коронавирусной инфекцией: у пяти (5,5%) женщин с клиническими проявлениями инфекции и у трех (3,3%) пациенток с бессимптомным течением болезни. Примечательно, что во всех случаях у беременных с выявленной абсолютной лимфоцитопенией одновременно наблюдались лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, относительная лимфоцитопения и ускоренная СОЭ.

Достоверных отличий между гематологическими показателями опытной и контрольной группы, а также между показателями беременных с клиническими проявлениями инфекции и без таковых выявлено не было, кроме показателя содержания нейтрофилов в периферической крови. Отмечено, что у беременных с диагнозом COVID-19 без клинических проявлений инфекции достоверно чаще выявлялся нейтрофилез ($p=0,04$), чем в группе женщин с клиническими признаками инфекции. Повышенное количество лейкоцитов и С-реактивного белка может быть связано с вторичной бактериальной инфекцией.

Данные коагулологических показателей в опытной и контрольной группах представлены в табл. 5.

В ходе гемостазиологического обследования медианы коагулологических показателей в опытной и контрольной группах не выходили за пределы референсных значений, однако наблюдалось достоверное повышение протромбинового времени по Квику ($p=0,009$) и уровня фибриногена ($p=0,016$), а также снижение показателя МНО ($p=0,001$) в группе беременных с подтвержденным диагнозом COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Показатели МНО и протромбин по Квику, отражающий содержание факторов свертывания в процентах, характеризуют внешний путь свертывания крови. Повышение протромбинового времени по Квику наряду со снижением МНО указывает на гиперкоагуляционное состояние и свидетельствует о риске возникновения тромбозов и тромбоэмболических осложнений. Уровень

Таблица 5

Результаты гемостазиологических тестов у беременных с инфекцией COVID-19 (опытная группа) и без инфекции COVID-19 (контрольная группа)

Table 5

Results of hemostasiological tests in pregnant women with COVID-19 infection (experimental group) and without COVID-19 infection (control group)

Параметры	Контроль	Опыт	p
ПВ по Квику, сек.	101,6 (95,1–107,1)	93,4 (87,3–105,4)	0,009
МНО	0,94 (0,88–1,02)	1,03 (0,92–1,09)	0,001
АЧТВ, сек.	26,8 (24,9–28,9)	27,5 (24,5–30,6)	–
R	0,84 (0,79–0,92)	0,89 (0,8–1,01)	–
Фибриноген, г/л	3,9 (3,41–4,36)	3,42 (2,9–4,34)	0,016
D-димеры, нг/мл	98,5 (16–181)	164 (56–355)	–

Таблица 6

Результаты гемостазиологических исследований у женщин с клиническими проявлениями инфекции COVID-19 и без таковых

Table 6

Results of hemostasiological tests in women with clinical manifestations of COVID-19 infection and without clinical manifestations of COVID-19 infection in the experimental group

Параметры	Клиника есть	Клиники нет	p
ПВ по Квику, сек.	93,2 (87,3–103,0)	100,6 (89,2–106,9)	–
МНО	1,03 (0,92–1,09)	0,97 (0,92–1,07)	–
АЧТВ, сек.	27,9 (25,2–31,3)	25,1 (23,2–28,3)	0,008
R	0,91 (0,80–1,01)	0,80 (0,68–0,84)	0,003
Фибриноген, г/л	3,41 (2,9–4,34)	3,66 (2,96–3,74)	–
D-димеры, нг/мл	156 (56–355)	172 (48,5–454,5)	–

фибриногена повышается при инфекционных заболеваниях, в том числе и при вирусных инфекциях (COVID-19), так как он является белком острой фазы.

В ходе сравнения коагулологических показателей в группе беременных с клиническими проявлениями инфекции COVID-19 и без клинических проявлений инфекции наблюдалось достоверное укорочение теста АЧТВ ($p=0,008$) и снижение показателя R ($p=0,003$) у беременных с признаками острой коронавирусной инфекции (табл. 6).

Укорочение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и снижение показателя R свидетельствуют об активации системы гемостаза по внутреннему пути свертывания крови и риске тромбообразования. Такое состояние возможно при тромбозах, тромбоэмболиях, при наличии воспалительных очагов в организме.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные изменения (увеличение активности трансаминаз, билирубина, гипермагниемия, гипохлоремия, гипокальциемия, повышение уровня С-реактивного белка, фибриногена, лейкоцитоз, повышение протромбина по Квику, укорочение АЧТВ) свидетельствуют о необходимости периодического наблюдения за беременными и мониторинга лабораторных показателей, которые могут помочь



в дальнейшем предупредить развитие сопутствующей патологии, способствовать раннему началу терапии, а также иметь прогностическое значение при новой коронавирусной инфекции COVID-19.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rothan H.A., Byrareddy S.N. The epidemiology and pathogenesis of Coronavirus disease (Covid-19) outbreak. *J Autoimmun.* 2020;109:102433. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433.
2. Chen N., Zhou M., Dong X. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
3. Huang C., Wang Y., Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
4. Tezcan M.E. Baseline electrolyte abnormalities would be related to poor prognosis in hospitalized coronavirus disease 2019 patients. *New Microbes New Infect.* 2020;37:100753. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100753.
5. Wu C., Chen X., Cai Y. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with Coronavirus Disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020: e200994. [Epub ahead of print].
6. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I. Hematological findings and complications of COVID-19. *American Journal of Hematology.* 2020;95: 834–847.
7. Henry B.M., Santos de Oliveira M.H., Benoit S. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1021–1028. doi: 10.1515/ccim-2020-0369.
8. Lippi G., Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58;1131–1134. doi: org/10.1515/ccim-2020-0198.
9. Ruan Q., Yang K., Wang W. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846–848. doi: 10.1007/s00134-020-06028-z.
10. Tian S., Hu N., Lou J. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J. Infect.* 2020;80:401–406.
11. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708–20. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
12. Wynants L., Van Calster B., Collins G.S. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19 infection: Systematic review and critical appraisal. *BMJ.* 2020;369:m1328. doi: 10.1136/bmj.m1328.
13. Wu C. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* 2020. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
14. Zhou F., Yu T., Du R. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1054–62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
15. Dadak K., Makatsaria A.D., Blinov D.V. Clinical and biochemical aspects o the use of magnesium preparations in obstetrics, gynecology and perinatology. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2014;8(2):69–78. (in Russian)
16. Di Filippo L., Formenti A.M., Rovere-Querini P. Hypocalcemia is highly prevalent and predicts hospitalization in patients with COVID-19. *Endocrine.* 2020;68:475–478. doi: 10.1007/s12020-020-02383-5.
17. Pigarova E. Physiology of calcium metabolism in the kidneys. *Obesity and metabolism.* 2011;8(4):3–8. (in Russian)



ALdeewan M.A.¹, Hameed O.F.²✉, Maktoof Z.A.²

¹ Ports Teaching Hospital, Basrah, Iraq

² University of Basrah, Basrah, Iraq

Histopathological Evaluation of Biopsy Material of the Endometrium of Premenopausal and Postmenopausal Women with Abnormal Uterine Bleeding

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: ALdeewan M.A. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review & editing; Hameed O.F. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review & editing, visualization; Maktoof Z.A. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review & editing, visualization, supervision, project administration.

The article is published in the author's edition.

Submitted: 13.06.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: medicalresearch602@yahoo.com

Abstract

Introduction. Abnormal uterine bleeding (AUB) is defined as a fluctuation in the menstrual cycle that can occur at any age in women, the changes happen in the cycle frequency, in the duration, in the intermenstrual periods and in the amount of the blood loss.

Purpose. To evaluate the histopathological changes of the endometrium in curetting specimens of premenopausal and postmenopausal women who complain of AUB.

Materials and methods. A retrospective study of a total of 159 cases of AUB collected from the pathology department in the period between (2019–2021). This study was done by slides review of formalin-fixed paraffin-embedded endometrial tissue stained by hematoxylin and eosin to be examined microscopically for any abnormalities.

Results. Histopathologic examination of the 159 cases showed various patterns in AUB. Normal cyclic changes including the proliferative phase represent the most common finding (18.5%) at the mean age of 40.21 ± 8.38 . While Arias Stella reaction represents the least percentage (1.3%) at the mean age of 42.00 ± 5.66 . The most common clinical presentation was seen as irregular vaginal bleeding in cases of a retained product of gestation (RPOG) (30.1%).

Conclusions. The importance of evaluation of histological changes of endometrium in AUB in different age groups from (16–70 years) is to detect the diagnosis precisely and determine the underlying etiology, thus, helping in the management of a disease. In the postmenopausal age group, excluding or confirming malignancy in this age group is the most important objective.

Keywords: abnormal uterine bleeding, endometrial biopsy, endometrial hyperplasia, hematoxylin, eosin, Arias Stella reaction, irregular vaginal bleeding, postmenopausal women, premenopausal women



Альдиван М.А.¹, Хамид О.Ф.²✉, Мактуф З.А.²

¹ Портовая учебная больница, Басра, Ирак

² Университет Басры, Басра, Ирак

Гистопатологическая оценка биопсийного материала эндометрия женщин пременопаузального и постменопаузального возраста с аномальными маточными кровотечениями

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Альдиван М.А. – концептуализация, методология, формальный анализ, исследование, ресурсы, курирование данных, написание – первоначальный проект, проверка и редактирование; Хамид О.Ф. – концептуализация, методология, формальный анализ, исследование, ресурсы, курирование данных, написание – первоначальный проект, проверка и редактирование, визуализация; Мактуф З.А. – концептуализация, методология, формальный анализ, исследование, ресурсы, курирование данных, написание – первоначальный проект, проверка и редактирование, визуализация, надзор, администрирование проекта.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 13.06.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: medicalresearch602@yahoo.com

Резюме

Введение. Аномальные маточные кровотечения (АМК) определяют как колебания менструального цикла, которые могут возникать в любом возрасте у женщин. Изменения происходят в частоте цикла, продолжительности, межменструальных периодах и объеме кровопотери.

Цель. Оценить гистопатологические изменения эндометрия в препаратах выскабливания женщин пременопаузального и постменопаузального возраста с жалобами на АМК.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное исследование 159 случаев АМК, собранных в патолого-анатомическом отделении в период с 2019 по 2021 г. Это исследование было проведено путем просмотра слайдов ткани эндометрия, фиксированной формалином и залитой парафином, окрашенной гематоксилином и эозином, для микроскопического исследования на наличие каких-либо аномалий.

Результаты. Гистопатологическое исследование 159 случаев показало различные паттерны АМК. Нормальные циклические изменения, включая пролиферативную фазу, представляют собой наиболее частую находку (18,5%) в среднем возрасте $40,21 \pm 8,38$ года. В то же время реакция Ариаса-Стеллы составляет наименьший процент (1,3%) в среднем возрасте $42,00 \pm 5,66$ года. Наиболее частой клинической картиной были нерегулярные вагинальные кровотечения в случаях задержки продукта гестации (30,1%).

Выводы. Важность оценки гистологических изменений эндометрия при АМК в различных возрастных группах (от 16 до 70 лет) заключается в точной постановке диагноза и установлении основной этиологии, что помогает в лечении заболевания. В постменопаузальной возрастной группе наиболее важной задачей является исключение или подтверждение злокачественного новообразования.

Ключевые слова: аномальные маточные кровотечения, биопсия эндометрия, гиперплазия эндометрия, гематоксилин, эозин, реакция Ариаса-Стеллы, нерегулярные вагинальные кровотечения, женщины в постменопаузе, женщины в пременопаузе

■ INTRODUCTION

Abnormal uterine bleeding (AUB) is defined as a fluctuation in the menstrual cycle that can occur at any age in women, it is described as changes in the frequency of the cycle, duration, or bleeding in the intermenstrual periods, but sometimes it is seen as changes in the amount of the blood loss [1].

AUB may occur due to many different causes; these causes can be structural as fibroids, polyps, endometrial hyperplasia, endometrial carcinoma, and complications of pregnancy or cause related to disorders in function as dysfunctional uterine bleeding (DUB) [2].

A menstrual cycle frequency can be decreased (less than 21 days cycles) or increased (more than 35 days cycles) and the duration of fewer than 2 days or more than 7 days, all these cases are considered AUB [3].

Biopsies from the endometrium are required in certain situations and ages mainly in cases of suspected neoplasia, and incomplete abortion and to determine the cycle phases in the treatment of infertility, but also it is important to obtain a biopsy from the endometrium in cases of AUB to direct the diagnosis and treatment [4].

AUB is due to many etiologic reasons ranging homeostasis like infections, hormonal imbalances, malignancy and structural lesions. In 2011, International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) devised a classification named PALM-COEIN for the AUB etiology. Adenomyosis, polyps, malignancy and leiomyoma are the structural features of PALM. Ovulatory dysfunction, coagulation defects, iatrogenic causes, endometrial causes, and non-classified causes are addressed as non-structural causes of COEIN [5]. Endometrial biopsies are used as a diagnostic aid in the AUB. Initially test done in females >45 years and done in women <45 years of age with a history of failed medical management, unopposed estrogen exposure and persistent AUB [6]. The prime advantage is to rule out the precursor lesions of cancer like aggressive endometrial carcinoma and hyperplasia [5].

This study is designed to present the histopathological findings of endometrium biopsies in cases of AUB in different age groups in Basrah city.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To evaluate the histopathological changes of the endometrium in curetting specimens of premenopausal and postmenopausal women who complain of AUB.

■ MATERIALS AND METHODS

A retrospective study of a total of 159 cases of DUB collected from the pathology department in Alkawaneh teaching hospital in Basrah City received in the period between (2019–2021). Routinely, suspected samples received by our team of laboratory. All samples



put and fixed in a solution of 10% formalin. Then each sample examined macroscopically for gross features. After that, samples processing and embedded in paraffin blocks. Thereafter, the paraffin blocks were sectioned by a microtome into 4 to 8 μ which fixed into glass slides, then stained by Hematoxylin and Eosin. Then slides microscopically examined by a histopathologist. Copies of reports archived in the laboratory. The reports retrieved and the diagnosis of the gross and histological characters were extracted. If there are doubts a review of slides, blocks of tissue, and gross specimens for second look must be done. The data collected for the study were statistically analyzed using a one-way ANOVA test. P-value <0.0001 was considered significant.

■ RESULTS

Histopathologic examination of the 159 cases showed various patterns in AUB. Normal cyclic changes including the proliferative phase represent the most common finding (18.5%) at a mean age of 40.21 ± 8.38 .

While Arias Stella reaction represents the least percentage (1.3%) at the mean age of 42.00 ± 5.66 as shown in Table 1.

The most common clinical presentation was seen as irregular vaginal bleeding in cases of a retained product of gestation RPOG (30.1%) as seen in Table 2.

Table 1
The frequency of occurrence of certain forms of pathological and physiological conditions in women of premenopausal and postmenopausal age

Diagnosis	No.	%	Age Mean \pm SD (years)
Proliferative phase	29	18.5	40.21 \pm 8.38
Retained product of gestation (RPOG)	25	15.9	29.96 \pm 7.22
Endometrial polyp	19	12.1	48.89 \pm 9.94
Endometrial hyperplasia without atypia	19	12.1	46.79 \pm 4.29
Hormonal related changes	14	8.9	33.29 \pm 9.99
Hydatidiform mole	12	7.6	32.50 \pm 8.46
Endocervical polyp	9	5.7	56.00 \pm 9.94
Secretory phase	7	4.5	42.71 \pm 7.65
Nonsecretory phase	5	3.2	49.20 \pm 0.84
Carcinoma of cervix	4	2.5	59.75 \pm 7.76
Chronic endometritis	3	1.9	47.33 \pm 9.0
Atypical endometrial hyperplasia	3	1.9	53.67 \pm 10.21
Endometrial adenocarcinoma	3	1.9	62.00 \pm 9.00
Atrophic endometrium	3	1.9	51.33 \pm 4.93
Arias Stella reaction	2	1.3	42.00 \pm 5.66
Total	157	100	42.06 \pm 11.82

Table 2
The frequency of occurrence of bleeding in various forms of physiological and pathological conditions

Diagnosis	Clinical presentation			Total	Significant
	Menorrhagia	Irregular vaginal bleeding	Postmenopausal vaginal bleeding		
Secretory phase	3	2	2	7	FE=99.32 P=0.0001
	5.8%	2.7%	6.3%	4.5%	
RPOG	3	22	0	25	
	5.8%	30.1%	0	15.9%	
Proliferative phase	13	14	2	29	
	25%	19.2%	6.3%	18.5%	
Endometrial polyp	11	2	6	19	
	21.2%	2.7%	18.8%	12.1%	
Endocervical polyp	0	3	6	9	
	0	4.1%	18.8%	5.7%	
Endometrial hyperplasia without atypia	12	2	5	19	
	23.1%	2.7%	15.6%	12.1%	
Hydatidiform mole	0	12	0	12	
	0	16.4%	0	7.6%	
Carcinoma of cervix	1	1	2	4	
	1.9%	1.4%	6.3%	2.5%	
Hormonal related changes	2	12	0	14	
	3.8%	16.4%	0	8.9%	
Chronic endometritis	1	1	1	3	
	1.9%	1.4%	3.1%	1.9%	
Atypical endometrial hyperplasia	1	0	2	3	
	1.9%	0	6.3%	1.9%	
Non-secretory phase	2	2	1	5	
	3.8%	2.7%	3.1%	3.2%	
Endometrial adenocarcinoma	1	0	2	3	
	1.9%	0	6.3%	1.9%	
Atrophic endometrium	0	0	3	3	
	0	0	9.4%	1.9%	
Arias Stella reaction	2	0	0	2	
	3.8%	0	0	1.3%	

■ DISCUSSION

Endometrium as a dynamic tissue undergoes cyclic proliferation and shedding under hormonal control, however, these hormonal changes depending on the patient's age can be Physiological or pathological leading to uterine bleeding continuing from menarche to menopause [7].

Endometrial biopsy and curettage are important for the diagnosis of AUB, it is also necessary to obtain a complete clinical history of the menstrual cycle and the drug history especially the exogenous hormones, yearly about 6% of women aged 25–44 years had consulted their physician about excessive blood loss during menstruation [8].

In this study, the most common cause of AUB was a proliferative phase (18.5%) which was consistent with a previous study carried out by Vaidya et al. which mentioned that



endometrial hyperplasia was the most common finding because of the stimulation of proliferation by estrogen [2].

The second finding was Retained product of gestation RPOG (15.9%) at a mean age of 29.96 ± 7.22 , also in another study done by Asuzu and Olaofe (2018) there was a high percentage of AUB because of Products of conception retention especially in childbearing age [4].

Endometrial hyperplasia without atypia represents 12.1% which was inconsistent with a study done by Vaidya et al. (30%) and also, Azim et al. study showed a percentage of only 4.9%, this may be explained by the difference in the selected age group since the estrogen effect becomes more obvious in later ages leading to different rates among adolescence, reproductive age with largely perimenopausal and menopausal age groups [2, 3].

AUB related to hormonal changes represents 8.9% at a mean age of 33.29 ± 9.99 this may relate to anovulatory cycles were described by Elmaogullari and Aycan, 2018 that many physiological causes or polycystic ovary syndrome lead to Delayed or absent ovulation and due to endometrium proliferation induced by lack of progesterone and excessive E2 production from ovarian follicles which make the endometrium more prone to changes in amount and timing of menstrual bleeding [9].

1.9% of cases diagnosed as adenocarcinoma which causes AUB since it is preceded by endometrial hyperplasia [10]. The carcinoma of cervix and adenocarcinoma were seen in older age groups since there is an elevated risk of cancerous changes with age.

■ CONCLUSIONS

The importance of evaluation of histological changes of endometrium in AUB in different age groups from (16–70 years) is to detect the diagnosis precisely and determine the underlying etiology, thus, helping in the management of a disease. In the postmenopausal age group, excluding or confirming malignancy in this age group is the most important objective.

■ REFERENCES

1. Vani B.S., Vani R., Bai P.J. Histopathological evaluation of endometrial biopsies and curettings in abnormal uterine bleeding. *Trop J Pathol Microbiol.* 2019;5(4):190–197.
2. Vaidya S., Lakhey M., Vaidya S., Sharma P.K., Hirachand S., Lama S. Histopathological pattern of abnormal uterine bleeding in endometrial biopsies. *Nepal Med Coll J.* 2013;15(1):74–77. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24592801/> <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2012.08.01.25>
3. Azim P., Khan M.M., Sharif N., Khattak E.G. Evaluation of Abnormal Uterine Bleeding on Endometrial Biopsies. 2011;3(3):84–88. *ISRA MEDICAL JOURNAL.* Available at: <http://www.imj.com.pk/wp-content/uploads/2013/07/33-OA1.pdf>
4. Asuzu I.M., Olaofe O.O. Histological Pattern of Endometrial Biopsies in Women with Abnormal Uterine Bleeding in a Hospital in North Central Nigeria. *Int J Reprod Med.* 2018;2018:1–5. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/2765927>
5. Sharma R., Mishra P., Kumar N., Srivastava P. Histomorphological spectrum of endometrial lesion in women presenting with abnormal uterine bleeding: a 3-year study at a tertiary care center. *Trop J Pathol Microbiol.* 2018;4:525–531.
6. Sajitha K., Padma S.K., Shetty K.J., Kishan Prasad H.L., Permi H.S., Hegde P. Study of histopathological patterns of endometrium in abnormal uterine bleeding. *CHRISMED J Health Res.* 2014;1:76–81.
7. Samal R., Vaithy A., Shanmugasamy, Habeebullah S. Clinicopathological analysis of abnormal uterine bleeding in reproductive and postmenopausal women in a tertiary care center of Southeastern India. *Indian Journal of Obstetrics and Gynecology Research.* 2020;7(1):66–70. Available at: <https://doi.org/10.18231/ijog.2020.014>
8. Uma K., Dasgupta A., Das A., Biradar S. A two-year study on histopathological pattern of endometrial biopsies in patients with abnormal uterine bleeding in a teaching hospital, Devanahalli. *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology.* 2021;4(3):142–145. Available at: <https://doi.org/10.33545/pathol.2021.v4.i3c.403>
9. Elmaogullari S., Aycan Z. Abnormal Uterine Bleeding in Adolescents: Management. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2018;10(3):191–197. Available at: https://www.uptodate.com/contents/abnormal-uterine-bleeding-in-adolescents-management/print?source=see_link
10. Prasannalakshmi S., Sughanya Krishnaveni V. *Histopathological Correlation of Abnormal Uterine.* 2018;1(31):1–4. Available at: <https://asclepiusopen.com/clinical-research-in-obstetrics-and-gynecology/volume-1-issue-2/6.pdf>



Husain T.H.✉, Salman A.H., Abd Oun R.D., Hamzah H.J.
Al-Elwiya Maternity Educational Hospital, Baghdad, Iraq

Comparison of the Quality of Taking and the Efficiency of Histological Examination of Tissue Samples Obtained Using a Pipette (Pipette (Pipelle) Method) and Methods of Classical Dilatation and Curettage

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Husain T.H. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft; Salman A.H. – conceptualization, investigation, resources, data curation, visualization; Abd Oun R.D. – resources, data curation, writing – original draft, writing – review & editing; Hamzah H.J. – formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft.

The article is published in the author's edition.

Submitted: 13.06.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: medicalresearch22@yahoo.com

Abstract

Introduction. Many methods were invented to obtain endometrial tissue samples to evaluate and realize the reason for abnormal vaginal bleeding.

Purpose. To compare endometrial histology of the sampling specimen by Pipelle with hysterectomy specimens, and D&C biopsy.

Materials and methods. A total of 50 premenopausal and postmenopausal women were prospectively included in this study and were scheduled for hysterectomy, two samples from each patient were taken one by Pipelle device and the other after the hysterectomy. Both were analyzed at the same pathology laboratory.

Results. The patient's mean age was 51.2 ± 7.7 years. Endometrial thickness was more than normal in 37.5% of premenopausal women (>10 mm) and in 83.3% of postmenopausal women (>5 mm). The final histopathology reports were the same in women who had D&C biopsy followed by hysterectomy. Pipelle endometrial histopathology results were in agreement with Hysterectomy histopathology results in 48 patients out of 50 patients, this yielded 96% sensitivity for the Pipelle endometrial sampling device. Invasive well-differentiated endometrial adenocarcinoma was found in 2 cases, they were identical in both, thus this study yielded 100% sensitivity for the Pipelle sampling device in confirming endometrial cancer. Pipelle sampling failed to get adequate samples for histopathology in two samples, which gave 96% adequacy for histopathology.

Conclusions. Pipelle endometrial sampling is an accurate and cost-effective method in diagnosing patients with endometrial disease.

Keywords: Pipelle Endometrial Sampling, Dilatation and Curettage, Endometrial thickness, hysterectomy



Хусейн Т.Х.✉, Салман А.Х., Абд Оун Р.Д., Хамза Х.Дж.
Учебный родильный дом Аль-Эльвия, Багдад, Ирак

Сравнение качества взятия и эффективности гистологического исследования образцов ткани, полученных с использованием пипетки (способом Пиппеле) и методами классической дилатации и кюретажа

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Хусейн Т.Х. – концептуализация, методология, формальный анализ, исследование, ресурсы, обработка данных, написание – первоначальный вариант; Салман А.Х. – концептуализация, исследование, ресурсы, обработка данных, визуализация; Абд Оун Р.Д. – ресурсы, курирование данных, написание – первоначальный вариант, проверка и редактирование; Хамза Х.Дж. – формальный анализ, исследование, ресурсы, обработка данных, написание – первоначальный вариант.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 13.06.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: medicalresearch22@yahoo.com

Резюме

Введение. Существует множество методов для получения образцов ткани эндометрия, чтобы понять и оценить причину аномального вагинального кровотечения.

Цель. Сравнить гистологию эндометрия в образце, взятом способом Пиппеле, с образцами, полученными после гистерэктомии и биопсией D&C (дилатация и кюретаж).

Материалы и методы. В общей сложности 50 женщин в пременопаузе и постменопаузе были проспективно включены в это исследование, и им была назначена гистерэктомия, было взято по два образца от каждой пациентки, один с помощью пипетки, а другой после гистерэктомии. Оба были проанализированы в одной и той же лаборатории.

Результаты. Средний возраст составил $51,2 \pm 7,7$ года. Толщина эндометрия была больше нормы у 37,5% женщин в пременопаузе (>10 мм) и у 83,3% женщин в постменопаузе (>5 мм). Окончательные гистопатологические отчеты были одинаковыми у женщин, которым была проведена биопсия D&C с последующей гистерэктомией. Результаты гистопатологии эндометрия способом Пиппеле совпали с результатами гистопатологии гистерэктомии у 48 пациенток из 50, что продемонстрировало 96%-ю чувствительность устройства для взятия проб эндометрия способом Пиппеле. Инвазивная высококодифференцированная аденокарцинома эндометрия была обнаружена в 2 случаях, они были идентичными; таким образом, это исследование продемонстрировало 100%-ю чувствительность устройства для отбора проб способом Пиппеле в подтверждении рака эндометрия. В двух образцах способом Пиппеле не удалось получить адекватные образцы для гистопатологии.

Выводы. Забор эндометрия способом Пиппеле является точным и экономически эффективным методом диагностики у пациенток с заболеванием эндометрия.

Ключевые слова: забор эндометрия способом Пиппеле, дилатация и кюретаж, толщина эндометрия, гистерэктомия

■ INTRODUCTION

Endometrial hyperplasia relates to excessive cellular proliferation leading to a rising volume of endometrial tissues. Endometrial hyperplasia is further classified based on the complexity of endometrial glands and cytological atypia, resulting in a classification system of simple or complex hyperplasia, with or without atypia. The most common presentation of endometrial hyperplasia is abnormal uterine bleeding, including menorrhagia, and inter-menstrual bleeding [1, 2].

The WHO classified glandular/stroma architectural patterns, which are either simple or complex. The presence or absence of nuclear atypia is classified into simple atypical hyperplasia and complex atypical hyperplasia [2–5].

Simple hyperplasia represents a very low risk of cancer progression. It is reported that the majority spontaneously regress [2, 4], 18% persist [2], 3% progress to complex atypical hyperplasia [5], and 1% progress to endometrial adenocarcinoma [4, 5]. Complex hyperplasia is reported to regress in the majority of cases, with 22% persisting and 4% progressing to endometrial carcinoma, with a mean duration to progression of approximately 10 years. Both simple and complex hyperplasia is, therefore, not considered pre-neoplastic forms [3].

Complex atypical hyperplasia has been reported to progress in 29% of cases, with a mean duration to progression of 4.1 years [2]. Endometrial hyperplasia with cytological atypia may carry a higher risk of coexistent invasive carcinoma than previously believed [14] with recent studies showing up to 50% of women with atypia having an endometrial carcinoma in subsequent hysterectomy specimens [5–7].

Screening for endometrial hyperplasia and cancer is generally not warranted in asymptomatic women, except those with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Women taking tamoxifen are at increased risk of developing endometrial hyperplasia, endometrial polyps, and endometrial cancer and sarcoma although the risk increases are statistically significant only in postmenopausal women [8, 9]. An endometrial biopsy should be performed in all women with abnormal uterine bleeding in whom endometrial hyperplasia or carcinoma is a possibility [9].

Asymptomatic women with benign-appearing endometrial cells noted on cervical cytology should undergo endometrial biopsy if they are at increased risk of endometrial cancer (e.g. postmenopausal, family or personal history of ovarian, breast, colon, or endometrial cancer; tamoxifen use; chronic anovulation; obesity; estrogen therapy; prior endometrial hyperplasia; diabetes) [10–12].

In the UK, hysteroscopy remains the gold standard investigation for abnormal uterine bleeding. Other techniques include blind endometrial biopsy, directed biopsy, dilatation and curettage, transvaginal ultrasound, and sono-hysterography. Blind endometrial biopsy techniques are commonly performed using the Pipelle and endometrial lavage. Meta-analysis of 28 of 7914 women has shown Pipelle biopsy to have the highest sensitivity (81%) for the overall detection of atypical endometrial hyperplasia [13–16].

A prospective randomized control trial of Pipelle versus curettage in women with abnormal uterine bleeding revealed a 96% agreement between biopsy pathology and final diagnosis for both procedures [17]. The combination of hysteroscopy with dilatation and curettage or endometrial biopsy, therefore, appears to be a superior diagnostic tool compared with hysteroscopy, dilatation, and curettage or endometrial biopsy performed alone [18, 19].



Transvaginal ultrasound assessment of endometrial thickness is of proven value in the investigation of abnormal uterine bleeding. When considering an endometrial thickness of >5 mm, a meta-analysis of 33 of 35 studies revealed high sensitivity and specificity for detecting endometrial disease. Studies on sono-hysterography and Pipelle biopsy have shown high sensitivity (94%) comparable to that for hysteroscopy and dilatation and curettage in detecting endometrial pathology. Both transvaginal ultrasound and sono-hysterography should be performed in conjunction with endometrial biopsy [20, 21].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To compare endometrial histology of the sampling specimen by Pipelle with hysterectomy specimens and D&C biopsy.

■ MATERIALS AND METHODS

Study design and setting

A total of 50 women presented with abnormal uterine bleeding were prospectively included in this study. They were scheduled for a hysterectomy. D&C biopsy was done. Full history was taken, and full examination was done. A pelvic ultrasound scan is done on all of them to assess the endometrial thickness, uterine shape, and position and to screen for any abnormality in the ovaries and adnexia. Endometrial samples were taken from each patient by Pipelle sampling instrument preoperatively and sent for histological examination. The histology results of Pipelle endometrial sampling were compared with the histology results of the preoperative D&C biopsy and postoperative hysterectomy results and all were done in the same laboratory.

Inclusion criteria

50 patients were diagnosed previously by D&C biopsy due to abnormal uterine bleeding for which a hysterectomy was planned.

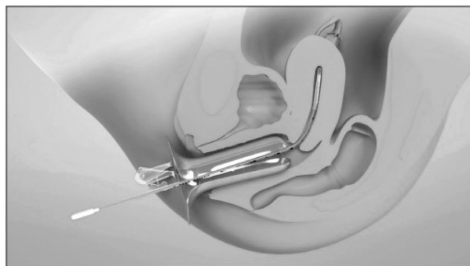
Exclusion criteria

Women planned for hysterectomy due to cervical cancer, uterine fibroids, ovarian tumors, or prolepses.

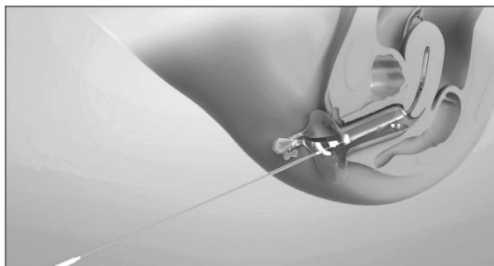
Procedures

A woman is placed in a lithotomy position and a bimanual examination is performed to determine the uterine size and position. Then pick up a sterile speculum from the sterile tray and place it in the vagina. The cervix was anesthetized and then cleaned with a povidone-iodine solution. The cervix was gently probed with the sterile sound after stabilizing the cervix with a tenaculum placed on the anterior lip of the cervix grabbing enough tissue to avoid laceration of the cervix. The endometrial catheter was inserted into the cervix, avoiding contamination from nearby tissue up to the fundus of the uterus until resistance was felt, then the internal piston of the catheter was fully withdrawn, creating suction at the catheter tip. The catheter was moved with an in-and-out motion taking care not to exit the internal os of the cervix, which maintains the vacuum effect than a 360-degree twisting motion was done to move the catheter between the uterine fundus and the internal os. At least four up and down motions were done to ensure that adequate tissues are obtained in the catheter, once the catheter was filled with tissues, the catheter

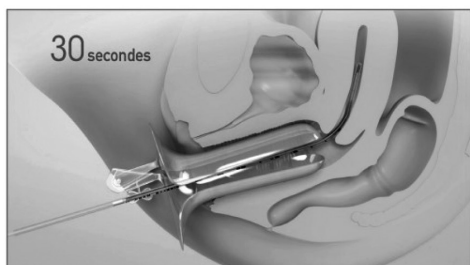
Easy to use



1- Insert the Pipelle until reaching the uterine fundus



2- In one movement, pull on the plunger to bring it as far as it will go



3- Sweep the uterus for 30 seconds, in back-and-forth movements and rotations



4- Cut the tip of the Pipelle



5- Push the plunger back in again to empty the content

Pipelle method of sampling [<https://www.eurosurgical.co.uk/gynaecology/1997-2/>]

was withdrawn, and the sample was placed in a formalin container. The tenaculum was gently removed (Figure).

Statistical analysis

Data were entered into SPSS version 20, descriptive statistics were applied as mean, SD, frequencies, and percentage.

RESULTS

Fifty patients with a history vaginal bleeding were recruited for the study. Their mean age of (51.2±7.7 years), with a range of 30 years minimum age years and maximum age of 70 years. Eighty-eight percent of patients were housewives and 94% of them were Iraqi. Eighty-six percent of patients were from urban, while 14% were from rural. According to marital status, 72% were married and 20% were widows. Family history of cancer was positive in 6 (12%) women, HT in 12%, asthma in 4% and DM in 6%. Surgical history was positive in 33 (66%) patients, 26% had D &C. and 20% had CS in the past (Table 1).

The mean age of menarche was (12.7±0.60 years). The mean duration of the menstrual cycle was (5.7±1.9 days), with a minimum of 2 days and a maximum of 10 days. Length of menstrual period range between 15 days to 32 days, with a mean equal to (28.5±2.7 days). Regular menstrual periods were recorded in 84% and a normal amount of blood



Table 1
The demographic of the study

Variables	No.	%	
Age (years)	40–49	24	48
	50–59	17	34
	60–69	6	12
	≥70	3	6
Job	Housewife	44	88
	Teacher	4	8
	Nurse	1	2
	Lawyer	1	2
Nationality	Iraqi	47	94
	Non	3	6
Residency	Urban	43	86
	Rural	7	14
Marital status	Married	36	72
	Divorce	4	8
	Widow	10	20
History of cancer	Yes	3	6
	No	47	94
DM	Yes	3	6
	No	47	94
HT	Yes	6	12
	No	44	88
Bronchial asthma	Yes	2	4
	No	48	96
Surgical history	CS	10	20
	Appendectomy	3	6
	D&C	13	26
	Cholecystectomy	5	10
	Polypectomy	1	2
	Thyroidectomy	1	2
	No	17	34

loss in 62%, while 38% mentioned that their cycles were heavy. Eighteen (36%) of patients were postmenopausal. The median duration of menopause was 5.5 years with a minimum of one year and a maximum of 20 years. Nulliparity was recorded in one (2%) patient only, and gravida 6 or more in 60%. A parity of 6 and more was recorded in 36%, with a mean parity of (5.1±2 children), with a range equal to 9 children. Abnormal bleeding was the main complaint of the patients in 40%, menorrhagia in 38%, postcoital bleeding in 6%, postmenopausal bleeding in 34%, dysmenorrhoea in 28%, and others complained of vaginal discharge and lower abdominal pain in 20% of cases. History of ever using contraceptives was positive in 22 (44%), 24% of them used combined oral contraceptive pills and 20% did use an IUC device. The mean duration of oral contraceptive use was (2.14±1.3 years) with a range of 5.6 years, while the mean duration of using the intrauterine contraceptive device was (3.4±1.13 years) with a range of 6 years (Table 2).

Table 2
Gynecologic and obstetric history of women

Variables	No.	%	
Age at menarche (years)	12	16	32
	13	23	46
	14	3	6
	Un-identify	8	16
Duration of menstrual period (days)	2-7	40	80
	>7	10	20
Length of menstrual period (days)	15-24	2	4
	25-34	48	96
Regularity of cycle	Regular	42	84
	Irregular	8	16
Blood loss amount	Normal	31	62
	Heavy	19	38
Menopause duration (years)	1-5	9	50
	6-10	2	11.1
	11-15	6	33.3
	16-20	1	5.6
Gravidity	Nulliparous	1	2
	1-5	19	38
	6-10	28	56
	>10	2	4
Parity	Nulliparous	1	2
	1-5	31	62
	6-10	16	32
	>10	2	4
Abortion	1	10	20
	2	12	24
	3	3	6
	Non	25	50
Chief complain	Menorrhagia	19	38
	Intermenstrual bleeding	20	40
	Post-coital bleeding	3	6
	Postmenopausal bleeding	17	34
	Dysmenorrhea	14	28
	Other: VD and pain	10	20
Contraceptive	CCP (Oral)	12	24
	Intrauterine device	10	20
	No	28	56

About 58% of the patient's blood group was O+. Systolic blood pressure was high in 27 (54%) of the patient 140 mmHg, normal in 23 (46%). The mean systolic blood pressure was (136.6±12.87 mmHg). Diastolic blood pressure was ≥90 mmHg in 19 (38%) of the patients with a mean of (83.7±7.8 mmHg). Speculum examination identifies bleeding in 10% and abnormal vaginal discharge in 20%. Ultrasound findings were abnormal in 40%



of patients (polycystic ovarian, bulky uterus, and small-size uterus). Hemoglobin level was <11 in 20% of patients, with a mean of $(8.7 \pm 4.8 \text{ g/dl})$, minimum hemoglobin level was 8.5 g/dl and maximum level was 13.2 g/dl . Endometrial thickness was more than normal in 37.5% of premenopausal women and 83.3% in postmenopausal women (Table 3).

The histopathology results of the endometrial tissues obtained by D&C were completely the same as those endometrial tissues obtained by hysterectomy and the Pipelle endometrial samples.

The Pipelle endometrial histological results were in agreement with Hysterectomy histology results in 48 patients out of 50 patients, there for this study yielded 96% sensitivity for the Pipelle endometrial sampling device. In two patients the Pipelle failed to get an adequate sample. Comparing Pipelle and hysterectomy histology for individual patients. Simple glandular endometrial hyperplasia without atypia was identical in 10 patients, but in two patients the Pipelle failed to detect polyps, while by hysterectomy sample both were identified.

Complex endometrial hyperplasia with mild atypia was found in 9 patients, and the results were identical in both groups. Complex endometrial hyperplasia with severe atypia was identified in 4 patients and was reported in both groups. Simple and complex endometrial hyperplasia without atypia, were identified in 14 samples of hysterectomy, while detected in 13 samples of Pipelle, because one sample of Pipelle was not adequate for histology. Simple complex endometrial hyperplasia with reactive atypia was present in 5 samples and was identical in both groups.

Table 3
Examination and investigation of women

Variables	No.	%	
Blood group	O+	29	58
	A+	11	22
	B+	7	14
	O-	3	6
Systolic BP (mmHg)	<140	23	46
	≥ 140	27	54
Diastolic BP (mmHg)	<90	31	62
	≥ 90	19	38
US	Abnormal	20	40
	Normal	30	60
Speculum examination	Normal	35	70
	Bleeding	5	10
	Discharge	10	20
Hb (g/dl)	<11	10	20
	≥ 11	40	80
Endometrium thickness (n=32) premenopause	$<10 \text{ mm}$	20	62.5
	$\geq 10 \text{ mm}$	12	37.5
Endometrium thickness (n=18) postmenopause	$<5 \text{ mm}$	3	16.7
	$\geq 5 \text{ mm}$	15	83.3

Table 4
Histopathology distribution

Histopathology	Pipelle	D&C	Hysterectomy	Accuracy (%)
Simple glandular endometrial hyperplasia without atypia	10	10	10	100
Complex endometrial hyperplasia with mild atypia	9	9	9	100
Complex endometrial hyperplasia with severe atypia	4	4	4	100
Simple and complex endometrial hyperplasia without atypia	13	14	14	93
Simple and complex endometrial hyperplasia with reactive atypia	5	5	5	100
Acute on (and) chronic endometritis	1	1	1	100
Hypersecretory endometrial with mild atypia	1	1	1	100
Cystic atrophic endometrial with degeneration	2	3	3	66.7
Invasive well-differentiation endometrial carcinoma	2	2	2	100
Proliferative endometrium gland no atypia	1	1	1	100
Inadequate sample	2	0	0	0

■ DISCUSSION

A population-based study in Finland by Hinkula M. et al reported that a high number of birth, older age of first birth, long birth period, and a short premenopausal delivery-free period reduces the risk of endometrial hyperplasia and cancer in grand-multiparous women 46, history of abortion was positive in 50% of the patients, 24% had 2 abortion, with a mean (1.7±0.68 abortion) [22].

Kurman and colleagues retrospectively studied endometrial samples from 170 patients with untreated endometrial hyperplasia followed by a mean of 14.3 years. They found that progression to carcinoma occurred in 1% of patients with simple hyperplasia, 3% in patients with complex hyperplasia, 8% in patients with simple atypical hyperplasia, and 29% in patients with complex atypical hyperplasia [2]. Acute on (and) chronic endometritis, hypersecretory endometrium with mild atypia, and proliferative endometrium gland no atypia was found in one sample and were reported in both groups [13].

Well-differentiated endometrial adenocarcinomas were found in 2 samples, there were identical in both groups. This confirmed the 100% sensitivity of the Pipelle sampling device in detecting endometrial cancer. Thomas G. et al study found that the sensitivity of the device in detecting endometrial carcinoma was 97.5% [42], and Schneider J., et al, gave a 100% sensitivity result for cancer diagnosis [23].

Invasive cystic atrophic endometrium with degenerative changes was found in 3 samples of hysterectomy, while found in two samples of the Pipelle group. It was due to the inadequacy of the sample. Pipelle sampling failed to get adequate tissue in two samples, which gave it 96% adequacy for histological evaluation [24, 25].

■ CONCLUSIONS

Adequate preoperative histological assessment of the endometrium is feasible with Pipelle biopsies and they are highly accurate in detecting endometrial malignancy,



with 100% sensitivity. The only disadvantage of this study for Pipelle, it failed to get an adequate sample in two patients and failed to detect polyps. The cost of D&C was 6 times the cost of Pipelle.

We recommend the use of Pipelle endometrial sampling when we suspect endometrial pathology through careful assessment of the patient by history and examination as an alternative method to D&C biopsy, aiming to reduce the cost and overcome some problems related to D&C biopsy, such as the risk of general anesthesia, uterine perforation, and others.

■ REFERENCES

1. Scully R.E., Bonfiglio T.A., Kurman R.J. Uterine corpus, In Scully R.E., Poulsen H.E., Sobin L.H. (eds) *Histological Typing of Female Genital Tract Tumors*. New York: Springer-Verlag: 1994;13.
2. Kurman R.J., Kaminiski P.F., Norris H.J. The behaviour of endometrial hyperplasia A long-term study of untreated hyperplasia in 170 women. *Cancer*. 1985;56:403–412.
3. Lidor A., Ismajovich B., Confino E., Davides M.P. Histopathologic finding in 226 women with post-menopausal uterine bleeding. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1986;65:41–3.
4. Palmer J.E., Perunovic B., Tidy J.A. Endometrial hyperplasia. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2008;10:211–216.
5. Howard A. Zacur, Robert L. Giuntoli, Marcus Jurema. *Endometrial hyperplasia literature review*. September 15, 2006 Official reprinted Up To Date <http://www.uptodate.com>. P. 118.
6. Terakawa N., Kigawa J., Taketani Y., Yoshikawa H., Yajima A., Noda K. The behavior of endometrial hyperplasia: a prospective study. Endometrial Hyperplasia Study Group. *J Obstet Gynaecol Res*. 1997;23:223–30.
7. Montgomery B.E., Daum G.S., Duntun C.J. Endometrial hyperplasia A review. *Obstet Gynecol*. 2004;59:368–78.
8. Trimble C.L., Kauderer J., Zaino R.J., Silverburg S., Lim P.C., Burke J.J. 2nd. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia. Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 2006;106:812–9. doi: 10.1002/cncr.21650(Medline).
9. Zaino R.J., Kauderer J., Trimble C.L., Silverburg S.G., Curtin J.P., Lim P.C. Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 106:804–11.
10. Gucer F., Reich O., Tamusino K., Bader A.A., Pieber D., Scholl W. Concomitant endometrial hyperplasia in patients with endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1998;69:64–8.
11. Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol*. 2004;94:256–66.
12. Cheng W.F., Lin H.H., Torng P.L., Huang S.C. Comparison of endometrial changes among symptomatic tamoxifen- treated and non-treated premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. *Gynecol Oncol*. 1997;66:233.
13. Lipscomb G.H., Lopatine S.M., Stovall T.G., Ling F.W. A randomized comparison of the Pipelle, Accurate, and Explora endometrial sampling devices. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:591.
14. Silver M.M., Miles P., Rosa C. Comparison of Novak and Pipelle endometrial biopsy instruments. *Obstet Gynecol*. 1991;78:828.
15. Stovall T.G., Solomon S.K., Ling F.W. Endometrial sampling prior to hysterectomy. *Obstet Gynecol*. 1989;73:405.
16. Dijkhuizen F.P., Mol B.W., Brolmann H.A., Heintz A.P. The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia. A meta-analysis. *Cancer*. 2000;89:1765–72.
17. Clark T.J., Mann C.J., Shah N., Khan K.S., Song F., Gupta J.K. Accuracy of outpatients endometrial biopsy in the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80:784–93.
18. Stovall T.G., Ling F.W., Morgan P.L. A prospective, randomized comparison of Pipelle endometrial sampling device with the Novak curette. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:1287–90.
19. Ben-Yehuda O.M., Kim Y.B., Leuchter R.S. Does hysterectomy improve upon the sensitivity of dilatation and curettage in the diagnosis of endometrial hyperplasia or carcinoma? *Gynecol Oncol*. 1998;68:4–7.
20. Lemer J., Timor-Tritsch I., Monteagudo A. Use of transvaginal sonography in the evaluation of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Obstet Gynecol Surv*. 1996;51:718.
21. Fleischer A.C., Wheeler J.E., Lindsay I. An assessment of the value of ultrasonographic screening for endometrial disease in postmenopausal women without symptoms. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184:70.
22. Mariane Hinkula, Ero Pukkala, Pentti Kyronen; Grandmultiparity and incidence of endometrial cancer; A population-based study in Finland. *International journal of cancer*. 2002;98(6):912–15.
23. Schneider J., Centeno M.M., Ausin J. Use of the corier Pipelle as the only means of pre-surgical histological diagnosis in endometrial carcinoma: agreement between initial and final histology. *Eur J Gynecol Oncol*. 2000;21(1):74–5.
24. Ceci O., Bettocchi S., Pellegrino A., Impedevol L.D., Venere R., Pansini N. Comparison of hysteroscopic and hysterectomy finding for assessing the diagnostic accuracy of office hysteroscopy. *Fertil Steril*. 2002;78:628–31.
25. Creasman W.T., Odicino F., Miasonneuve P. Carcinoma of corpus uteri lot. *Journal gynecol obst*. 2003;83:79.



Полуян О.С.✉, Костюк С.А., Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Усовершенствование и клиническая апробация метода определения уровней нормализованной экспрессии генов костного гомеостаза (COL1A1) и рецептора витамина D (VDR) в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Полуян О.С., Костюк С.А.; сбор материала – Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.; обработка материала, написание текста – Полуян О.С.; редактирование – Костюк С.А.

Подана: 28.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: olga.poluyan@mail.ru

Резюме

Цель. Усовершенствование и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта.

Материалы и методы. В исследование включено 123 образца биологического материала (соскоб клеток эпителия ротовой полости), в которых с использованием усовершенствованного метода ПЦР в реальном времени проводили определение уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Статистическая обработка данных проводилась с помощью SPSS 16 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 перцентилей – Me (25/75), сравнение независимых групп количественных переменных проводили с использованием критерия Манна – Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Результаты. В ходе исследования подобраны нуклеотидные последовательности пар праймеров и молекулярных зондов, меченных флуоресцентными красителями, оптимизированы состав амплификационной смеси и температурные профили реакции амплификации. Для нормализации использовали ген человека HPRT1. Усовершенствованный метод, основанный на использовании мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, специфических пар праймеров и зондов, можно использовать для одновременной амплификации целевого гена (COL1A1 и VDR) и референсного гена HPRT1 при определении уровней нормализованной экспрессии указанных генов в биологическом материале пациентов с заболеваниями периодонта.



Заключение. Проведенные молекулярно-генетические исследования с использованием усовершенствованного метода позволили получить количественные данные уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в образцах биологического материала пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта. С использованием непараметрических методов статистического анализа установлено отсутствие ($p > 0,05$) статистически значимых достоверных различий в уровнях нормализованной экспрессии гена VDR, тогда как для гена COL1A1 такие различия установлены ($p < 0,05$), за исключением групп 1-4, 2-3, 2-4 и 3-4.

Ключевые слова: ПЦР, ген α -1 цепи коллагена 1-го типа, ген рецептора витамина D, уровни нормализованной экспрессии, заболевания периодонта

Poluyan O.✉, Kostiuk S., Melnikova T., Yudina N.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Improvement and Clinical Testing of the Method for Determining the Normalized Expression Levels of Bone Homeostasis Gene (COL1A1) and Vitamin D Receptor Gene (VDR) in Biological Material of Patients with Inflammatory Periodontal Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Poluyan O., Kostiuk S.; collection of material – Melnikova T., Yudina N.; material processing, text writing – Poluyan O.; editing – Kostiuk S.

Submitted: 28.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: olga.poluyan@mail.ru

Abstract

Purpose. Improvement of the molecular genetic method for determining the normalized expression levels of the COL1A1 and VDR genes and its clinical approbation in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases.

Materials and methods. The study included 123 samples of biological material (scraping of the epithelial cells of the oral cavity), in which, using an improved real-time PCR method, the levels of normalized expression of the COL1A1 and VDR genes were determined. Statistical data processing was carried out using SPSS 16 (SPSS Inc.). All quantitative data had a non-parametric distribution and are presented as median values (Me) indicating 25/75 percentiles: Me (25/75), comparison of independent groups of quantitative variables was performed using the Mann-Whitney test. The critical level of significance in testing statistical hypotheses was the level $p < 0.05$.

Results. In the course of the study, the nucleotide sequences of pairs of primers and molecular probes labeled with fluorescent dyes were selected, the composition of the amplification mixture and the temperature profiles of the amplification reaction were optimized. The human HPRT1 gene was used for normalization. An improved method based on the use of multiplex real-time PCR, specific pairs of primers and probes, can

be used for simultaneous amplification of the target gene (COL1A1 and VDR) and the reference gene HPRT1 in determining the levels of normalized expression of these genes in the biological material of patients with periodontal diseases.

Conclusion. Conducted molecular genetic studies using an improved method made it possible to obtain quantitative data on the levels of normalized expression of the COL1A1 and VDR genes in samples of biological material from patients with inflammatory periodontal diseases. Using non-parametric methods of statistical analysis, it was found that there were no ($p>0.05$) statistically significant differences in the levels of normalized expression of the VDR gene, then for the COL1A1 gene such differences were established ($p<0.05$), except for groups 1-4, 2-3, 2-4 and 3-4.

Keywords: PCR, type 1 collagen α -1 gene, vitamin D receptor gene, normalized expression levels, periodontal disease

■ ВВЕДЕНИЕ

Болезни пародонта – ведущая стоматологическая проблема. Наибольшей распространенности (60–65%) периодонтит достигает у людей старше 30 лет [1]. Одной из задач лечения пациентов с заболеваниями пародонта становится профилактика или устранение функциональной перегрузки пародонта, которая на определенной стадии болезни оказывается одним из главных патогенетических факторов, определяющих ее течение.

Авторы многих работ указывают на взаимосвязи болезней с нарушением метаболизма костной ткани организма и патологией пародонта. Так, у пациентов с тяжелой потерей минеральной плотности кости (МПК) отмечается достоверное повышение риска тяжелых форм генерализованного периодонтита [2]. В ряде исследований [3, 4] продемонстрирована значимая корреляция ($p<0,02$) между потерей плотности костной ткани в периферическом скелете и потерей МПК в челюстях.

Коллаген 1-го типа является основным белком матрикса соединительной (до 25–30%) и костной (90%) тканей. Он придает механическую прочность и выполняет морфогенетическую функцию, влияя на рост, миграцию и дифференцировку клеток, определяя их секреторную и синтетическую активность. Структурно он образован из α 1- и α 2-полипептидных цепей, синтез которых у человека детерминирован двумя соответствующими генами – COL1A1 и COL1A2. В настоящее время известны мутации в этих генах, приводящие к развитию переломов, остеопений, а также полиморфизмы, ассоциированные со снижением минеральной плотности костной ткани [5]. К настоящему времени одним из генов-кандидатов снижения минеральной плотности костной ткани является ген α -1 цепи коллагена 1-го типа (COL1A1) [6].

Нарушение образования гормонов и их дефицит также могут стать причиной развития патологии пародонта. Дефицит витамина D, обладающего широким спектром биологических свойств и участвующего в регуляции многих важных физиологических процессов, также имеет негативные последствия и лежит в основе ряда заболеваний [2]. До недавнего времени наиболее изученным свойством витамина D была его регуляция кальций-фосфорного гомеостаза. Однако новые данные отечественных и зарубежных авторов позволяют расширить представления о подлинном его



влиянии на разнообразные биологические эффекты. Витамин D имеет свой ядерный рецептор, в связи с этим его относят к гормоноподобным соединениям и даже часто называют D-гормоном [7]. Молекулярные механизмы действия витамина D связаны с наличием участков ДНК, с которыми происходит связывание комплекса гормон – рецептор в генах, кодирующих трансэпителиальные кальциевые каналы в эпителиоцитах кишечника и почках, а также в гене RANKL, который отвечает за созревание, активацию и продолжительность жизни остеокластов [8, 9]. Рецептор витамина D входит в суперсемейство стероидных ядерных рецепторов и обязателен для реализации большинства известных биологических эффектов витамина D [8, 10].

Изучение влияния молекулярно-генетических факторов на риск развития тяжелых форм воспалительных заболеваний периодонта является весьма важным для современной персонифицированной и предиктивной медицины, поскольку дает возможность прогнозировать развитие заболевания, характер течения и риск возможных осложнений.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усовершенствование и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологического материала для установления функционального состояния генов COL1A1 и VDR использовали соскоб клеток эпителия ротовой полости 108 пациенток репродуктивного возраста с заболеваниями периодонта, проходивших амбулаторное лечение на базе кафедры общей стоматологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», а также 15 практически здоровых женщин, составивших группу контроля.

Всем пациенткам диагноз устанавливали на основании клинических параметров и рентгенологической картины. В группу 1 (n=26) «хронический гингивит» (МКБ-10 K05.10 – хронический простой маргинальный гингивит) относили пациенток с признаками воспаления десны, без потери зубодесневого прикрепления, глубина зондирования десневой борозды не превышала 3 мм. Группы с хроническим периодонтитом отличались наличием периодонтальных карманов и потери зубодесневого прикрепления. В группу 2 (n=22) «хронический периодонтит» (МКБ-10 K05.30 – хронический простой периодонтит) включены пациентки с горизонтальной деструкцией костной ткани (по данным дополнительной, лучевой диагностики). В группу 3 (n=35) «хронический сложный периодонтит» (МКБ-10 K05.31 – хронический сложный периодонтит) включены пациентки с горизонтальной и вертикальной деструкцией костной ткани (по данным дополнительной, лучевой диагностики). В группу 4 (n=25) «сложный агрессивный периодонтит» (МКБ-10 K05.31 – хронический сложный периодонтит (агрессивная форма течения)) включены пациентки с хроническим сложным периодонтитом, у которых по данным анамнеза было установлено раннее начало заболевания (до 30 лет) с частым абсцедированием.

Учитывая возраст обследуемых пациенток (женщины до 44 лет) и высокую распространенность патологии периодонта (до 98% взрослого населения), существовали ограничения по включению женщин в группу контроля (здоровые, без истории

любого заболевания тканей периодонта, без клинических признаков воспаления десен, кровоточивости десны, рентгенологических признаков потери костной ткани, без потери зубодесневого прикрепления на любой поверхности зуба. Таким образом, в исследование включено 15 женщин группы контроля, что достаточно для непараметрических методов статистического анализа.

Выделение РНК из образцов биологического материала, основанное на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей и их последующей элюции в низкосолевого буфера, проводили с использованием наборов реагентов «АртРНК MiniSpin» (производитель «АртБиоТех», Республика Беларусь). По окончании этапа пробоподготовки препарат РНК незамедлительно использовали для постановки реакции обратной транскрипции.

Определение концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda=230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230.

Расчет уровней нормализованной экспрессии целевых генов осуществлялся по формуле:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(\text{CT интересующего гена} - \text{CT гена omp1})} \times 100\%,$$

где CT – пороговый цикл (cycle threshold).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS, версия 16 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 перцентилей – Me (25/75). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна – Уитни (U-тест). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse), а также TaqMan-зонды (probe) для определения уровней нормализованной экспрессии гена COL1A1 и гена VDR.

С помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбранные последовательности «выравнивали» для выбора наиболее консервативных участков. Далее проводили «выравнивание» последовательностей ДНК исследуемых генов.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для выбранных гомологичных участков с использованием бесплатного программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold.

На основании проведенных исследований нами подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зонд (probe) для гена COL1A1: forward – CCTGGAATGAAGGGACACAGAGGT; reverse – TGACCAGGAGCTCCATTTTCACCA; probe – FAM-TGCTGGTCTGCTGGTCCTA-BHQ1. Для гена VDR: forward –



ACAGCATCCAAAAGGTGGTC; reverse – TGA^{CTT}CAGCAGCACGATCT, probe – FAM-TATGGGCAAAAACCCACAG-BHQ1.

Проведенная оценка специфичности выбранных наборов олигонуклеотидных праймеров и зондов с использованием онлайн-приложения NCBI/Blast подтвердила 100%-ную гомологию геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательность ДНК гена HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human) генома человека. Дизайн олигонуклеотидов начали с последовательности, расположенной в начале гена и протяженностью 1200 п. о.

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона Ic AGCGGTA ACCATGCGTATTTGACACACGAAGGAACTAGGGAAAAGGCATTAGGTCATTTCAAGCCGAAAT TCACATGTG.

В результате анализа с использованием алгоритма mfold установлено, что во время протекания ПЦР, а именно на стадии отжига/элонгации при +60 °C все вероятные вторичные шпилечные структуры будут нестабильны. Анализ с использованием алгоритма Vector NTI показал наличие 29 вероятных вторичных шпилечных структур. Стабильных структур выявлено не было. Результаты анализа олигонуклеотидных праймеров показали практически полное отсутствие негативных эффектов за счет гомо- и гетеродимеров.

Затем были проведены исследования по моделированию совместимости внутреннего контроля и олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков генов COL1A1 и VDR в условиях мультиплекс-ПЦР (две реакции в одной пробирке). При постановке совместных мультиплекс-реакций учитывались вероятные гетеродимеры олигонуклеотидов, которые компенсировались, исходя из пропорций и процентного соотношения стабильный гетеродимер / нестабильный гетеродимер. Как правило, является достаточным повышение концентрации олигонуклеотидов до 500–600 нМ.

Анализ вероятности совместного протекания специфической реакции с наборами олигонуклеотидов гена COL1A1 и гена VDR и внутреннего контроля показал, что в большинстве случаев выбранные олигонуклеотиды последнего не образуют стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров и зондов при определении экспрессии исследуемых генов последовательно проводили моноплексную ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Амплификацию для каждого гена проводили в 10 образцах, пробы ставили в дублях.

Состав амплификационной смеси включал в себя: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 3 мкл смеси F-праймер – R-праймер – P-зонд (все компоненты данной смеси в концентрации 3,2 рмоль/мкл) и 3 мкл соответствующей кДНК.

На основании расчета температуры отжига пар праймеров была выбрана программа амплификации: 95 °C – 15 мин.; 50 циклов: 95 °C – 20 с., 58 °C – 20 с., 72 °C – 15 с.; 1 цикл: 72 °C – 10 мин. при использовании термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Детекцию проводили по каналу Green, так как зонды для всех генов были мечены флуорофором FAM.

Таблица 1
Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР
Table 1
Threshold cycle values obtained from monoplex PCR

№ образца		Значения пороговых циклов (Ct)	
		для гена COL1A1	для гена VDR
1	1.1	29,24	23,15
	1.2	29,47	23,46
2	2.1	28,85	19,45
	2.2	28,33	19,54
3	3.1	20,05	25,16
	3.2	20,18	25,84
4	4.1	26,65	22,19
	4.2	26,71	22,23
5	5.1	27,14	28,87
	5.2	26,85	29,04
6	6.1	29,78	31,05
	6.2	29,06	31,33
7	7.1	24,52	26,74
	7.2	23,93	26,59
8	8.1	31,82	33,29
	8.2	31,03	33,47
9	9.1	30,13	21,13
	9.2	29,68	20,95
10	10.1	32,84	28,14
	10.2	32,55	28,34

Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени (табл. 1), для гена COL1A1 находились в пределах от 20,05 до 32,84, для гена VDR – в пределах от 19,45 до 33,47.

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофореграмме присутствовали четкие полосы на уровне детекции специфических фрагментов ДНК во всех анализируемых образцах.

После проведения электрофореза из геля извлекли фрагменты ДНК с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК, для оценки аналитической специфичности разработанной методики [11].

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) [11].

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в поисковой



онлайн-системе BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному гену. Все анализируемые образцы имели 100%-ную гомологию с зарегистрированными в базе данных последовательностями, что свидетельствовало о 100%-ной специфичности разработанной методики [11].

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны два образца (№ 3, 7) для проведения оценки эффективности (E) ПЦР-ПВ для гена COL1A1 и два образца (№ 2, 9) для проведения оценки эффективности (E) ПЦР-ПВ для гена VDR, так как значения пороговых циклов амплификации для указанного гена в данных образцах были самыми низкими.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов кДНК: с целью построения стандартной кривой. Концентрацию кДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК для изучаемого гена.

Для гена COL1A1 корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила 0,997. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,61. Для гена VDR корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила 0,998. Полученное значение эффективности ПЦР составило 1,72.

Количественное определение house-keeping гена проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемых целевых генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации для выбранного референсного гена HPRT1 было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, зонда, состава реакционной смеси и условий амплификации (которые были использованы и для целевых генов) рассчитанное значение эффективности протекания реакции для генов COL1A1 и VDR составило 1,67 и 1,63 соответственно. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена HPRT1 и исследуемых генов позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации целевого и референсного генов в одной пробирке.

В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-ПВ в одной пробирке одновременно амплифицировали исследуемый ген (COL1A1 или VDR) и референсный ген HPRT1. Детекцию целевого гена проводили по каналу Green, так как зонды были мечены флуорофором FAM, а детекцию гена HPRT1 проводили по каналу Orange, так как зонд для него был мечен флуорофором ROX.

В пробирки для амплификации вносили: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда целевого гена, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена HPRT1 и 3 мкл кДНК.

Для выбора оптимального режима амплификации при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (табл. 2) с учетом оптимальной температуры

Таблица 2
Тестируемые программы амплификации
Table 2
Tested amplification programs

Режим №	Программа амплификации
1	1 цикл: 95 °C – 15 мин.; 50 циклов: 95 °C – 20 с., 58 °C – 20 с., 72 °C – 15 с.; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
2	1 цикл: 95 °C – 10 мин.; 45 циклов: 95 °C – 20 с., 58 °C – 20 с., 72 °C – 15 с.; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
3	1 цикл: 94 °C – 10 мин.; 45 циклов: 94 °C – 20 с., 58 °C – 20 с., 72 °C – 20 с.; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
4	1 цикл: 94 °C – 15 мин.; 50 циклов: 94 °C – 20 с., 58 °C – 20 с., 72 °C – 20 с.; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.

Таблица 3
Значения пороговых циклов и УНЭ для гена COL1A1 и VDR
Table 3
Threshold cycles values and normalized gene expression levels for COL1A1 and VDR genes

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COL1A1	25,18	25,33	19,55	23,94	22,27	23,00	21,23	20,32	24,79	25,83
HPRT1	27,99	23,34	21,86	23,67	22,03	23,85	22,52	23,32	23,35	27,42
% УНЭ	14,26	397,24	20,17	20,58	118,10	55,48	40,90	12,50	271,32	33,22
VDR	18,79	21,56	13,51	3,58	19,26	26,11	29,12	27,73	25,54	28,09
HPRT1	23,18	26,48	22,54	27,11	26,94	25,63	29,38	22,97	23,59	24,42
% УНЭ	4,77	3,30	0,19	0,00	0,49	139,47	83,51	2709,58	386,37	1272,86

отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке. Амплификацию проводили с использованием термоциклера Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

Наилучший результат амплификации был достигнут при использовании режима 1. Значения пороговых циклов для гена COL1A1 находились в пределах от 19,55 до 25,83, для референсного гена HPRT1 – от 21,86 до 27,99; для гена VDR – в пределах от 3,58 до 29,12, для референсного гена HPRT1 – от 22,54 до 29,38.

Для апробации разработанного метода расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) целевого гена (табл. 3) осуществляли по формуле.

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что усовершенствованный метод можно использовать для одновременной амплификации целевого гена COL1A1 и референсного гена HPRT1, а также целевого гена VDR и референсного гена HPRT1. Полученные с использованием усовершенствованного метода данные оказались возможным использовать для расчета процента уровня нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Рассчитанные значения процента уровня нормализованной экспрессии генов



находились в пределах от 12,50 до 397,24% (для гена COL1A1) и в пределах от 0,00 до 2709,58% (для гена VDR).

На следующем этапе были проведены молекулярно-генетические исследования по определению уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR непосредственно в образцах биологического материала (соскоб клеток эпителия ротовой полости) пациенток с воспалительными заболеваниями периодонта.

На основании выполненных молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена COL1A1 для группы 1 составили Me (Q25/75) 123,54 (95,69/179,71)%, для группы 2 – 46,05 (20,59/126,08)%, для группы 3 – 22,38 (11,66/52,12)%, для группы 4 – 35,60 (14,95/215,21)%, для группы 5 – 338,70 (232,95/499,33)% (рис. 1).

Использование непараметрического критерия Манна – Уитни позволило сделать вывод о наличии статистически достоверных различий между некоторыми исследуемыми группами (табл. 4).

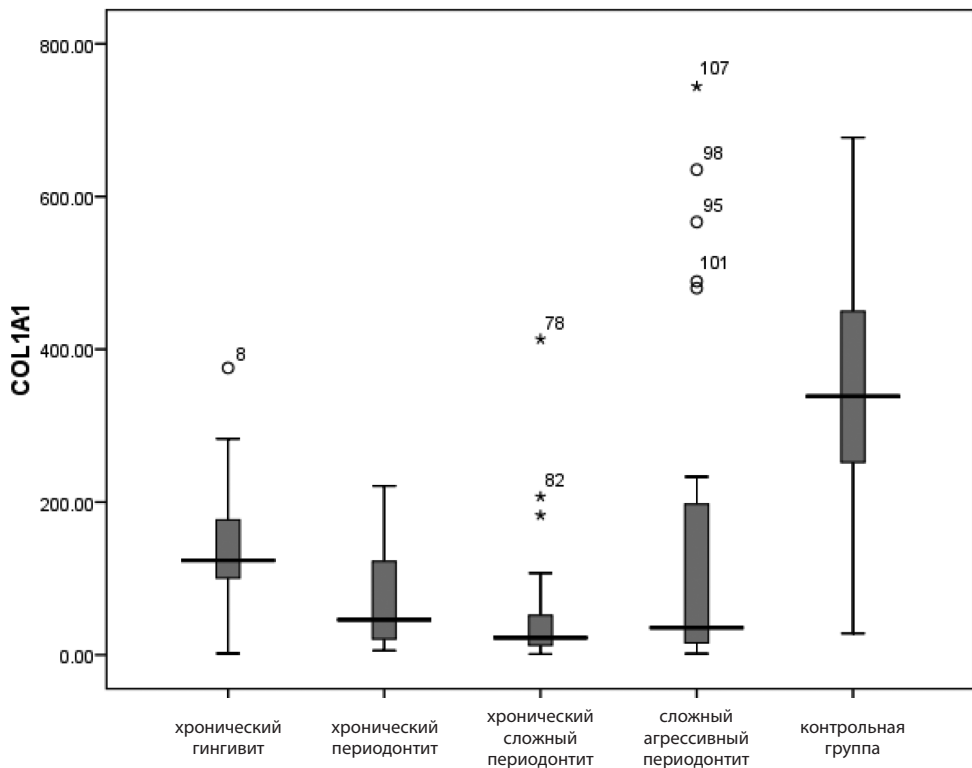


Рис. 1. Уровни нормализованной экспрессии гена COL1A1 в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта

Fig. 1. Normalized gene expression levels for COL1A1 gene in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases

Таблица 4
Статистические параметры критерия Манна – Уитни
Table 4
Statistical parameters of the Mann-Whitney test

Сравниваемые группы	Показатель Z	Показатель p
1-2	-2,638	0,008
1-3	-4,631	<0,001
1-4	-1,781	0,075
1-5	-4,168	<0,001
2-3	-1,746	0,081
2-4	-0,192	0,848
2-5	-4,547	<0,001
3-4	-1,162	0,245
3-5	-4,965	<0,001
4-5	-3,087	0,002

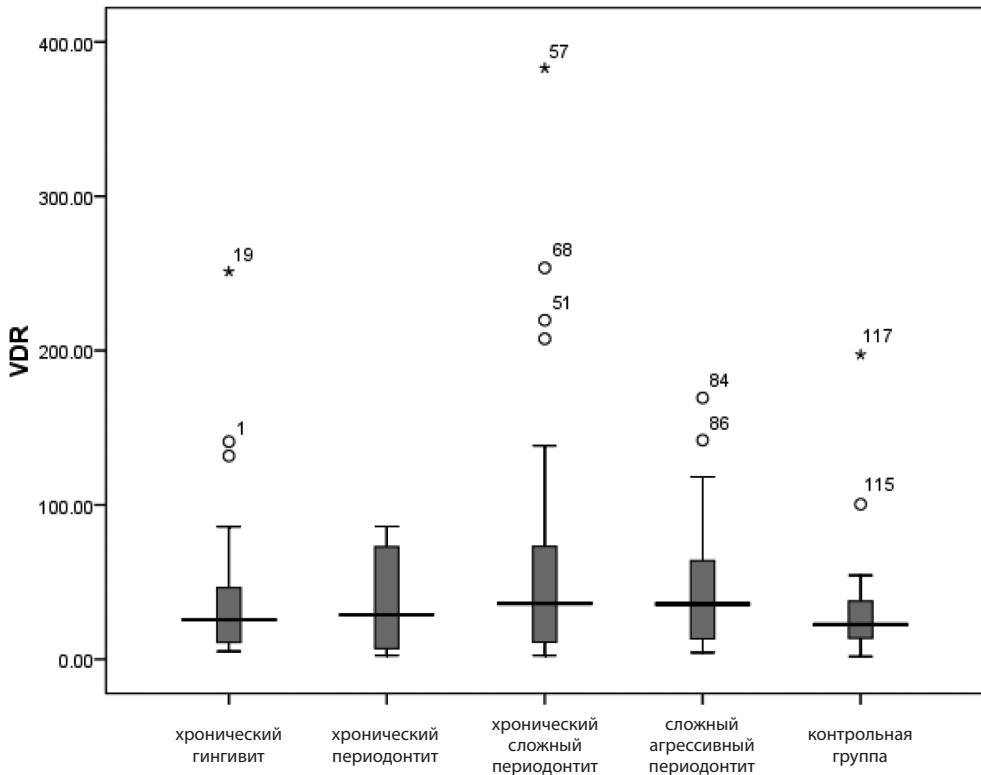


Рис. 2. Уровни нормализованной экспрессии гена VDR в биологическом материале пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта
Fig. 2. Normalized gene expression levels for VDR gene in the biological material of patients with inflammatory periodontal diseases



Таким образом, на основании проведенного статистического анализа установлено наличие достоверных ($p < 0,05$) различий между обследуемыми группами, за исключением групп 1-4, 2-3, 2-4 и 3-4.

Затем были проведены аналогичные исследования по определению уровней нормализованной экспрессии гена VDR. Для группы 1 значения Me (Q25/75) составили 25,61 (10,16/50,35)%, для группы 2 – 28,79 (6,68/73,05)%, для группы 3 – 36,07 (10,42/82,44)%, для группы 4 – 35,67 (12,67/82,84)%, для группы 5 – 22,47 (9,74/45,56)% (рис. 2).

При использовании непараметрического критерия Манна – Уитни установлено отсутствие статистически значимых ($p < 0,05$) достоверных различий по анализируемому признаку для всех групп.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненного исследования легли в основу усовершенствования молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR. Показано, что подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров и молекулярных зондов, меченных флуоресцентными красителями, позволяют проводить амплификацию генов COL1A1 и VDR, а также гена человека HPRT1 с применением ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в мультиплексном формате. В ходе определения аналитических характеристик установлено, что аналитическая специфичность амплификации генов COL1A1 и VDR составляет 100% соответственно.

Для стандартизации ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в качестве референсного гена для определения уровней экспрессии генов COL1A1 и VDR был выбран ген HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human), так как именно для него было установлено наиболее низкое значение коэффициента вариации.

Анализ полученных результатов позволил сделать вывод о том, что усовершенствованный метод, основанный на использовании мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, специфических пар праймеров и зондов, можно использовать для одновременной амплификации таргетного гена (COL1A1 и VDR) и референсного гена HPRT1 при определении уровней нормализованной экспрессии указанных генов в биологическом материале пациентов с заболеваниями периодонта.

При клинической апробации усовершенствованного метода рассчитаны количественные показатели уровней нормализованной экспрессии генов COL1A1 и VDR в образцах биологического материала пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта. Использование непараметрических методов статистического анализа позволило установить отсутствие ($p > 0,05$) статистически значимых достоверных различий в уровнях нормализованной экспрессии гена VDR, тогда как для гена COL1A1 такие различия установлены ($p < 0,05$), за исключением случаев сравнения пациентов с хроническим гингивитом (группа 1), хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3) с пациентами со сложным агрессивным периодонтитом (группа 4), а также при сравнении полученных данных по уровням нормализованной экспрессии между пациентами с хроническим периодонтитом (группа 2) и хроническим сложным периодонтитом (группа 3).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lebedenko I., Bragin E., Kalivradzhiyan E. *Orthopedic dentistry*. Moscow: GEOTAR-Media. 2016. 640 p. (in Russian)
2. Schwartz G. Vitamin D, D-hormone and alfacalcidol: medical, molecular biological and pharmacological aspects. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal*. 2009;3(37):62–66. (in Russian)
3. Ingraham B.A., Bragdon B., Nohe A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr. Med. Res. Opin.* 2008;24(1):139–149. doi: 10.1185/030079908x253519.
4. Skinner H.G., Michaud D.S., Giovannucci E. Vitamin D intake and the risk for pancreatic cancer in two cohort studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1688–1695. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0206.
5. Baranov V., Baranova E., Ivashchenko T. *The human genome and "susceptibility" genes (Introduction to predictive medicine)*. St. Petersburg: Intermedica. 2000. 270 p. (in Russian)
6. Dytfeld J., Marcinkowska M., Drwęska-Matelska N. Association analysis of the COL1A1 polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis. *Arch. Med. Sci.* 2016;12(2):288–294. doi: 10.5114/aoms.2016.59253.
7. Kotova S., Karlova N., Maksimova I., Zhorina O. *Formation of the skeleton in normal and pathological conditions*. St. Petersburg: St. Petersburg State Medical Academy named after I.I. Mechnikov; 2002. 49 p. (in Russian)
8. Holick M.F., Binkley N.C., Bischoff-Ferrari H.A. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–1930. doi: 10.1210/jc.2011–0385.
9. Pike J.W., Zella L.A., Meyer M.B. Molecular Actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2007;22:16–19. doi: 10.1359/jbmr.07s207.
10. Xue L.N., Xu K.Q., Zhang W. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(1):54–60. doi: 10.1002/ibd.22966.
11. Kostyuk S., Rudenkova T., Shimanskaya I. Method for determining gene expression levels. for the synthesis of collagen and elastin. in skin biopsies of patients with chronic dermatoses. associated with skin atrophy. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya.* 2017;2:179–187. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.012>
УДК 616-002.5:578.245



Будник О.А.¹✉, Суркова Л.К.¹, Иванова А.Л.¹, Путрик Т.В.¹, Кривошеева Ж.И.²

¹ Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,
Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Оценка эффективности скрининга латентной туберкулезной инфекции с помощью теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн, анализ материала – Суркова Л.К., Кривошеева Ж.И.; сбор информации и обработка материала – Иванова А.Л., Будник О.А., Путрик Т.В.; статистическая обработка материала – Иванова А.Л.; написание текста – Будник О.А.; редактирование текста – Кривошеева Ж.И., Суркова Л.К.

Подана: 27.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: olya.budnik@gmail.com

Резюме

Цель. Определить информативность иммунодиагностического теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона Т-клетками крови, в диагностике латентной туберкулезной инфекции.

Материалы и методы. В исследование включено 1815 пациентов, которым проведено тестирование на инфицирование микобактериями туберкулеза с использованием теста QFT-plus (Qiagen, Германия), выполненное в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии в период 2019–2022 гг. при проведении дифференциальной диагностики с легочной и внелегочной формами туберкулеза.

Результаты. Тестирование с помощью теста QFT-plus выявило инфицирование микобактериями туберкулеза у 23,69% (95% ДИ 21,7–25,6) лиц со значительной вариабельностью частоты инфицирования в разных возрастных группах с наиболее высокой частотой в группах пациентов в возрасте 0–20 лет и 61–70 лет (21,16% (95% ДИ 17,3–25,0) и 18,37% (95% ДИ 14,7–22,0) соответственно). В когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus после клинико-рентгенологического и лабораторного обследования латентная туберкулезная инфекция выявлена у 58,46% пациентов. Выявлены статистически значимые различия частоты латентной туберкулезной инфекции у пациентов с различными хроническими соматическими заболеваниями по сравнению с пациентами без сопутствующих заболеваний (75,44% (95% ДИ 70,6–85,7) и 24,56% (95% ДИ 16,7–32,5) соответственно ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$)).

Заключение. Тест QFT-plus обеспечивает точность и эффективность тестирования на инфицирование *M. tuberculosis* за счет клеточно-опосредованного иммунного ответа как CD4+ Т-клетками, так и CD8+ Т-клетками. QFT-plus не позволяет дифференцировать латентную и активную туберкулезную инфекцию. В то же время применение теста позволяет идентифицировать пациентов для углубленного обследования с целью выявления латентной туберкулезной инфекции и проведения лечения

в группах высокого риска развития латентного туберкулеза, что будет способствовать снижению заболеваемости туберкулезом.

Ключевые слова: туберкулезная инфицированность, тест, основанный на высвобождении гамма-интерферона, латентная туберкулезная инфекция, группы риска, диагностика латентного туберкулеза

Volha A. Budnik¹✉, Larisa K. Surkova¹, Anastasia L. Ivanova¹, Tatsiana V. Putryk¹, Zhanna I. Krivosheeva²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Evaluation of the Effectiveness of Screening for Latent Tuberculosis Infection Using a Test Based on the Release of Interferon Gamma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design, material analysis – Larisa K. Surkova, Zhanna I. Krivosheeva; collection of information and processing of material – Anastasia L. Ivanova, Volha A. Budnik, Tatsiana V. Putryk; statistical processing of the material – Anastasia L. Ivanova; writing the text – Volha A. Budnik; text editing – Zhanna I. Krivosheeva, Larisa K. Surkova.

Submitted: 27.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: olya.budnik@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the informative value of the immunodiagnostic test based on the release of gamma-interferon by T-cells of the blood in the diagnosis of latent tuberculosis infection.

Materials and methods. The study included 1815 patients who were tested for MBT infection using the QFT-plus test (Qiagen, Germany), performed at the Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiology in the period 2019–2022 during differential diagnosis with pulmonary and extrapulmonary forms of tuberculosis.

Results. Testing with the QFT-plus test revealed MBT infection in 23,69% (95% CI 21,7–25,6) of individuals, with the presence of variability in the frequency of infection in different age groups with the highest frequency in groups of people aged 0–20 years and 61–70 years (21,16% (95% CI 17,3–25,0) and 18,37% (95% CI 14,7–22,0 respectively)). In the cohort of patients with QFT-plus test results after clinical, radiological and laboratory studies, latent tuberculosis infection (LTBI) was detected in 58,46% of patients. Statistically significant rates of LTBI were found in patients with chronic somatic diseases compared with patients without concomitant diseases (75,44% (95% CI 70,6–85,7) and 24,56% (95% CI 16,7–32,5) respectively ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$)).

Conclusion. The QFT-plus assay provides accuracy and efficiency in testing for M.tuberculosis infection through a cell-mediated immune response from both CD4+ T-cells and CD8+ T-cells. QFT-plus does not allow differentiation between latent and active



TB infection. At the same time, the use of the test makes it possible to identify patients for in-depth examination in order to detect LTBI and provide treatment in groups at high risk of developing latent tuberculosis, which will help reduce the incidence of tuberculosis.

Keywords: tuberculosis infection, interferon-gamma release test, latent tuberculosis infection, risk groups, diagnosis of latent tuberculosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Контакт с микобактериями туберкулеза (МБТ) может привести к инфицированию макроорганизма человека, не проявляющегося клинико-рентгенологическими симптомами активного туберкулезного процесса. Единственным показателем состояния инфицирования МБТ является развитие стойкого иммунного ответа на стимуляцию антигенами МБТ при отсутствии клинико-рентгенологических проявлений активного туберкулеза, определяемое в настоящее время как латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ) [1].

ЛТБИ – состояние, при котором МБТ длительное время присутствуют в макроорганизме человека в «дремлющем» состоянии, обуславливая положительную реакцию на туберкулезные антигены.

По оценкам ВОЗ, 1/3 населения планеты инфицирована возбудителем туберкулеза. Без лечения от 5 до 10% инфицированных лиц в какой-то момент своей жизни заболевают активными формами туберкулеза и становятся источником распространения инфекции. ВОЗ признает, что основополагающим фактором для эффективной борьбы с туберкулезом является точное определение и лечение не только активной формы заболевания, но и ЛТБИ, что крайне важно для снижения туберкулезной нагрузки в обществе и предотвращения дальнейшего распространения заболевания [1].

До недавнего времени единственным убедительным свидетельством инфицирования МБТ без признаков активного туберкулеза являлась реакция гиперчувствительности замедленного типа, которая проявляется положительной реакцией на туберкулин. Постановка туберкулиновой пробы Манту 2 ТЕ ППД-Л позволяет выявить иммунитет и специфическую сенсibilизацию организма, обусловленные как инфицированием МБТ, так и введением вакцины БЦЖ, что не дает возможности проведения точного тестирования на туберкулезную инфекцию. В последние годы были внедрены в практику новые диагностические тесты, такие как Диаскинтест с рекомбинантным туберкулезным аллергеном и тесты, основанные на высвобождении гамма-интерферона (Interferon Gamma Release Assay – IGRA-тесты), или подсчет количества лимфоцитов в ответ на стимуляцию специфическими антигенами МБТ, позволяющие более точно диагностировать ЛТБИ, особенно у вакцинированных лиц. Наиболее значимыми антигенами МБТ являются ранний секретлируемый антиген – ESAT-6 (early secretory antigenic target 6), белок клеточного фильтрата – CFP-10 (culture filtrate protein 10) и пептид TB 7.7, которые кодируются геном RD1 (region of difference 1) генома *M. tuberculosis*. Указанные антигены отсутствуют в вакцинном штамме *M. bovis* BCG и у пациентов с выделением нетуберкулезных микобактерий, за исключением *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*.

В то же время IGRA-тесты, в частности QuantiFERON-TB Gold, отличаются меньшей чувствительностью у иммунокомпрометированных лиц и у детей младшего возраста [2], а также низкой корреляцией с риском прогрессирования активного туберкулеза [3].

Тест-система QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-plus) представляет собой новую более совершенствованную версию QuantiFERON-TB Gold, обеспечивая более точную оценку клеточно-опосредованного иммунного ответа на туберкулезную инфекцию как CD4+, так и CD8+ Т-клетками на множественные антигены с количественной оценкой результатов и высокой чувствительностью (95%) и специфичностью (98%).

Тест-система QFT-plus, основанная на принципах контакта лимфоцитов крови с высокоспецифическими антигенами ESAT-6, CFP-10, TB 7.7, включает пробирки TB1 для определения клеточного иммунного ответа CD4+-лимфоцитов (Т-хелперов) и TB2 (что позволяет одновременно оценить CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ), нулевую контрольную пробирку (Nil) – для контроля фоновых реакций и пробирку с митогеном (Mitogen) – положительный контроль.

Высокий процент ложноположительных результатов туберкулиновых проб (до 40%) по сравнению с результатами IGRA-тестов ведет к значительным финансовым затратам на дообследование туберкулиноположительных лиц. Применение тестов, основанных на высвобождении гамма-интерферона, обуславливает более точную диагностику ЛТБИ за счет повышения диагностической чувствительности и специфичности исследования. Точная диагностика ведет к снижению количества лиц с ложноположительными результатами и, соответственно, к снижению финансовых затрат на лечение пациентов с латентной туберкулезной инфекцией.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить информативность иммунодиагностического теста, основанного на высвобождении гамма-интерферона Т-клетками крови, в диагностике латентной туберкулезной инфекции.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ результатов тестирования на инфицирование МБТ в различных выборках лиц с использованием теста QFT-plus (Qiagen, Германия), выполненных в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии в период 2019–2022 гг.

Тестирование проводилось у лиц, направленных к фтизиатру для обследования и/или на консультацию, и у пациентов, которым требовалась дифференциальная диагностика с легочной и внелегочной формами туберкулеза, согласно инструкции производителя. Группы лиц были стратифицированы по возрасту без учета факторов риска и ВИЧ-инфицирования.

Результаты теста интерпретировались согласно критериям, установленным производителем тест-системы. Результат теста QFT-plus считается положительным (наличие инфекции *M. tuberculosis*), если значения IFN- γ в любых пробирках (TB1 или TB2) значительно превышают значение IFN- γ в нулевой контрольной пробирке, т. е. TB1 минус Nil $\geq 0,35$ МЕ/мл и $\geq 25\%$ Nil МЕ/мл. При отрицательном результате (отсутствие инфекции *M. tuberculosis*) значение TB1 или TB2 минус значение нулевой пробы должно быть $< 0,35$ МЕ/мл или $\geq 0,35$ МЕ/мл и $< 25\%$ Nil МЕ/мл значения нулевой пробирки. Слабый ответ на митоген $< 0,5$ МЕ/мл при отрицательных реакциях TB1



и TB2 указывает на сомнительный результат, который в большинстве случаев связан с нарушением взятия и транспортировки образцов. Уровень гамма-интерферона определялся методом ELISA, что обеспечивало измерение иммунного Т-клеточного ответа на МБТ.

Для исключения активного туберкулеза все лица с положительными результатами теста QFT-plus были обследованы клинически и рентгенологически (обзорная рентгенограмма или компьютерная томография органов грудной клетки).

Статистическую обработку материала производили с использованием программы Statistica 10.0. Использовали метод доверительных интервалов (95% ДИ) и критерий χ^2 Пирсона. Различия в сравниваемых группах считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период 2019–2022 гг. проведено тестирование инфицирования МБТ 1815 пациентам в возрасте от 3 до 93 лет (соотношение мужчин и женщин 1:1,3). Положительные результаты теста QFT-plus были получены у 23,69% (430/1815; 95% ДИ 21,7–25,6) пациентов.

Анализ результатов IGRA-тестирования инфицирования МБТ в зависимости от возраста пациентов выявил значительную вариабельность частоты инфицирования в разных возрастных группах. Лица в возрасте 0–20 лет составили 21,16% (91/430; 95% ДИ 17,3–25,0), 21–30 лет – 9,53% (41/430; 95% ДИ 6,8–12,3), 31–40 лет – 14,65% (63/430; 95% ДИ 11,3–17,9), 41–50 лет – 12,09% (52/430; 95% ДИ 9,0–15,2), 51–60 лет – 12,79% (55/430; 95% ДИ 9,6–15,9), 61–70 лет – 18,37% (79/430; 95% ДИ 14,7–22,0), 71–80 лет – 8,60% (37/430; 95% ДИ 5,9–11,3), 81–90 лет и старше – 2,79% (12/430; 95% ДИ 1,2–4,4) (табл. 1).

По данным IGRA-тестирования, высокий удельный вес инфицирования отмечен в возрастной группе до 20 лет, в возрасте от 21 до 30 лет инфицирование МБТ сохраняется, но на невысоких уровнях, однако к 61–70 годам число лиц, инфицированных МБТ, достоверно возрастает до 18,37% (79/430) по сравнению с другими возрастными группами старше 20 лет, за исключением группы лиц в возрасте 31–40 лет. Среди лиц пожилого возраста старше 70 лет и вплоть до 80 лет инфицированность сохраняется, но на более низких уровнях. Самая низкая инфицированность МБТ отмечена в возрастной группе 81–90 лет и старше – 2,79% (12/430; 95% ДИ 1,2–4,4).

Анализ количественных показателей продукции гамма-интерферона в когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus ($n=254$) показал, что величина продукции гамма-интерферона на стимуляцию CD4+ Т-клеток (TB1) и одновременно CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) варьировала в широких пределах от 0,35 МЕ/мл до 10 МЕ/мл.

Высокие значения уровня продукции гамма-интерферона одновременно в TB1 и TB2 установлены в 81,88% (208/284) случаев. Выявлена разница между величинами продукции гамма-интерферона для TB1 и TB2 у 46 пациентов (18,11%, 46/254), обусловленная более значительным одновременным CD4+ и CD8+ Т-клеточным иммунным ответом (TB2) либо ответом только CD4+ Т-клеток (TB1).

Повышенная продукция гамма-интерферона при комбинированной стимуляции CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) определялась у 47,82% (22/46) пациентов при более низких значениях гамма-интерферона на стимуляцию только CD4+ Т-клеток (TB1).

Таблица 1
Возрастная характеристика лиц с положительным результатом теста QFT-plus за период 2019–2022 гг.

Table 1
Age characteristics of individuals with a positive QFT-plus test result for the period 2019–2022

Показатель	Кол-во QFT	Кол-во положительных результатов	Возраст, абс. ч., %, 95% ДИ							
			0–20	21–30	31–40	41–50	51–60	61–70	71–80	81–90 и старше
			1	2	3	4	5	6	7	8
Абс.	1815	430	91	41	63	52	55	79	37	12
% (95% ДИ)	100	23,69 (21,7–25,6)	21,16 (17,3–25,0)	9,53 (6,8–12,3)	14,65 (11,3–17,9)	12,09 (9,0–15,2)	12,79 (9,6–15,9)	18,37 (14,7–22,0)	8,60 (5,9–11,3)	2,79 (1,2–4,4)

Примечания: достоверность: 2–6 – $\chi^2=13,985$ ($p<0,001$); 3–6 – $\chi^2=2,159$ ($p=0,142$); 4–6 – $\chi^2=6,565$ ($p=0,011$); 5–6 – $\chi^2=5,092$ ($p=0,025$); 6–7 – $\chi^2=17,578$ ($p<0,001$) 6–8 – $\chi^2=55,167$ ($p<0,001$).

В то же время у 52,17% (24/46) пациентов была выявлена разница между значениями TB1 и TB2 с более высокой продукцией гамма-интерферона на стимуляцию только CD4+ Т-клеток ($\chi^2=0,174$; $p=0,677$).

В литературе широко обсуждается вопрос о клинической специфичности продукции гамма-интерферона на стимуляцию одновременно CD4+ и CD8– Т-клеток множественными специфическими для МБТ антигенами. Считается, что CD8+ Т-клетки могут дать дополнительную клиническую информацию и чаще определяются у пациентов с активным туберкулезом по сравнению с ЛТБИ [4, 5] либо у недавно инфицированных МБТ лиц [6].

По данным C.L. Day et al., 2011 [4], CD8+ Т-клетки коррелируют с увеличением микобактериальной нагрузки и обнаруживаются у пациентов с активным туберкулезом легких.

Комбинация стимуляции одновременно CD4+ Т-клеток (TB1) и CD4+ и CD8+ Т-клеток (TB2) в определенной степени повышает точность и улучшает диагностику ЛТБИ у пациентов с низкой продукцией IFN- γ CD4+ Т-клетками.

Таблица 2
Характеристика пациентов с положительным результатом теста QFT-plus (n=195)

Table 2
Characteristics of patients with a positive QFT-plus test result (n=195)

Показатель	Кол-во положительных результатов	Активный туберкулез	Посттуберкулезные изменения	ЛТБИ, всего	В т.ч. ЛТБИ	
					без сопутствующих заболеваний	со множественными сопутствующими заболеваниями
					3.1	3.2
Абс.	195	73	8	114	28	86
% (95% ДИ)	100	37,43 (30,6–44,2)	4,10 (1,3–6,9)	58,46 (51,5–65,4)	24,56 (16,7–32,5)	75,44 (67,5–83,3)

Примечания: достоверность: 1–3 – $\chi^2=17,270$ ($p<0,001$); 3.1–3.2 – $\chi^2=59,018$ ($p<0,001$).



Получены доказательства участия Т-клеток CD8+ в защите организма от *M. tuberculosis* путем секреции IFN- γ и других факторов, активирующих макрофаги, подавляющие рост *M. tuberculosis* [7].

В когорте пациентов с положительными результатами теста QFT-plus ($n=195$) после клиничко-рентгенологического и лабораторного обследования ЛТБИ выявлялась у 58,46% лиц (114/195, 95% ДИ 51,5–65,4), по сравнению с активным туберкулезом – 37,43% (73/195, 95% ДИ 30,6–44,2) ($\chi^2=17,270$; $p<0,001$), посттуберкулезные изменения установлены у 4,10% (8/195; 95% ДИ 1,3–6,9) обследованных пациентов. ЛТБИ чаще выявлялась у пациентов с различными хроническими соматическими заболеваниями по сравнению с лицами без сопутствующих заболеваний – 75,44% (86/114; 95% ДИ 67,5–83,3) против 24,56% (28/114; 95% ДИ 16,7–32,5) соответственно ($\chi^2=59,018$; $p<0,001$) (табл. 2).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование инфицирования МБТ группы лиц, стратифицированных по возрасту, на основе теста количественной оценки состояния иммунного Т-клеточного ответа на стимуляцию специфическими антигенами выявило инфицирование МБТ у 23,69% пациентов. Наиболее высокая частота инфицирования отмечена в возрастных группах 0–20 и 61–70 лет.

Тест QFT-plus позволяет оценить выраженность клеточно-опосредованного иммунного ответа на инфицирование *M. tuberculosis* как для CD4+ Т-клеток, так и для CD8+ Т-клеток за счет введения новой пробы TB2, что обеспечивает точность и эффективность тестирования. Выявление несоответствия в величинах продукции IFN- γ в пробах TB1 и TB2 позволяет клиницисту получить дополнительную информацию о туберкулезной инфицированности у лиц с нарушением иммунной функции CD4+ Т-лимфоцитов (ВИЧ-инфицированные, лица, принимающие иммуносупрессивную терапию).

Выполнение теста QFT-plus не предоставляет возможности дифференцировать латентный и активный туберкулез. Установить или исключить диагноз активного туберкулеза возможно только в совокупности с рентгенологическими и другими клиничко-лабораторными данными. В то же время применение теста позволяет идентифицировать пациентов для углубленного обследования с целью выявления латентного туберкулеза и проведения терапии ЛТБИ в группах высокого риска, что делает целесообразным включение QFT-теста в диагностический комплекс фтизиатрического обследования.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. World Health Organization. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. Geneva, 2015 (in Russian).
2. Pai M., Zwerling A., Menzies D. Systematic review: T-cell based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infective: an update. *Ann. Intern. Med.* 2008;149(3):177–184. DOI: 10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241.
3. Sester M., Sotgiu G., Lange C. et al. Interferon γ -release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2011;37(1):100–111. DOI: 10.1183/09031936.00114810
4. Day C.L., Abrahams D.A., Lerumo L. et al. Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis specific T-cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 2011;187(5):222–232. DOI: 10.4049/jimmunol.1101122.
5. Rozot V., Viganò S., Mazza-Stalder J. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T-cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(6):1568–1577. DOI: 10.1002/eji.201243262.
6. Nikolova M., Markova R., Drenska R. et al. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;75(3):277–281. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.023.
7. Brookes R.H., Pathan A.A., McShane H. et al. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular Mycobacterium tuberculosis growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(12):3293–3302. DOI: 10.1002/eji.200324109.



Кириачков Ю.Ю.¹✉, Якубцевич Р.Э.¹, Муслимов Б.Г.², Лысенко И.Н.², Данилец В.В.²

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского, Зеленоград, Россия

Многокомпонентный тест оценки эффективности дексмететомидина как средства подавления симпатической гиперактивности при интенсивной терапии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Кириачков Ю.Ю. – разработка цели, метода исследования; Якубцевич Р.Э. – формирование раздела «Обсуждение»; Муслимов Б.Г. – работа с литературными источниками, систематизация материала, координация лабораторных исследований; Лысенко И.Н. – лабораторный мониторинг биохимических параметров; Данилец В.В. – выборка пациентов для проведения исследования, работа с клинической и электронной базой результатов.

Подана: 28.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: kirychyu@yandex.ru

Резюме

Цель. Разработка клинической фармакодинамической оценки эффективности дексмететомидина на основе мониторинга функциональных параметров автономной нервной, гормональной и иммунологической реактивности организма пациентов при проведении интенсивной терапии.

Материалы и методы. В исследование включено 16 пациентов, поступивших в лечебно-профилактическое учреждение в периоде более 21 суток после состоявшегося острого нарушения мозгового кровообращения либо травмы головного мозга (мужчин – 13, женщин – 3, средний возраст – $49,25 \pm 5,02$ года). Фармакодинамический тест выполнен на 21–30-е сутки развития повреждения головного мозга с внутривенным применением дексмететомидина при начальной скорости инфузии 0,66–1,11 мг/кг/ч в течение 180 минут (суммарно 200 мг, 0,01% – 2,0 мл). Затем внутривенная инфузия дексмететомидина проводилась со скоростью введения 0,14–0,28 мг/кг/ч в течение 24 часов (суммарно 400 мг, 0,01% – 4,0 мл). При фармакодинамическом тесте регистрировали функциональную активность автономной нервной системы по параметрам variability ритма сердца исходно, через 90, 180 минут и спустя 24 часа от начала применения препарата. Критерием начала инфузии препарата дексмететомидина (фирма Orion Pharma, Финляндия) служили электрофизиологические показатели variability ритма сердца, характерные для симпатической гиперреактивности (использовались 5-минутные записи кардиоинтервалов). Симпатическая гиперреактивность принималась в пределах значений для SDNN <4,54 мс, для RMSSD <2,25 мс, для pNN50% <0,109%, для SI >900 н. е. (нормализованные ед.), для TP <200 мс². Исходно и спустя 24 часа от начала применения препарата определяли содержание в сыворотке крови TNF- α , IL-6, кортизола, свободного миоглобина, С-реактивного белка, прокальцитонина, подклассов Т-лимфоцитов CD(3)(+) – зрелые лимфоциты, CD(4)(+)– Т-хелперы, CD(8)(+) – Т-лимфоциты, CD(4)(+)/CD(8)(+); CD(16)(+) киллеры.



Результаты. Дексмедетомидин устраняет симпатическую гиперактивность (параметры: SDNN, RMSSD, рNN50%, SI, TP), снижает уровень провоспалительных цитокинов крови (TNF- α , IL-6), маркеров системного воспаления (прокальцитонин, С-реактивный белок), уменьшает концентрацию стресс-гормона коры надпочечников (кортизол), тканевую гипоксию (свободный миоглобин) и снижает избыточную цитотоксическую функцию лимфоцитов.

Заключение. Разработанная схема достаточна для объективной оценки и раскрытия свойств дексмедетомидина по поддержанию гомеостаза организма.

Ключевые слова: фармакодинамический тест, вариабельность ритма сердца, дексмедетомидин, миоглобин, кортизол, прокальцитонин

Yuri Y. Kiryachkov¹✉, Ruslan E. Yakubtsevich¹, Bagautdin G. Muslimov², Inna N. Lysenko², Violetta V. Danilets²

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky, Zelenograd, Russia

A Multicomponent Test to Evaluate the Effectiveness of Dexmedetomidine as a Means of Suppressing Sympathetic Hyperactivity in Intensive Care

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Yuri Y. Kiryachkov – development of the purpose, research method; Ruslan E. Yakubtsevich – formation of the "Discussion" section; Bagautdin G. Muslimov – work with the references, systematization of the material, coordination of laboratory research; Inna N. Lysenko – laboratory monitoring of biochemical parameters; Violetta V. Danilets – selection of patients for the study, work with the clinical and electronic database of results.

Submitted: 28.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: kirychyu@yandex.ru

Abstract

Purpose. Development of clinical pharmacodynamic evaluation of dexmedetomidine efficacy based on monitoring of functional parameters of autonomic nervous, hormonal and immunological reactivity of patients during intensive therapy.

Materials and methods. The study included 16 patients (men – 13, women – 3, average age – 49.25 ± 5.02), over 21 days with the consequences brain damage. A single pharmacodynamic test was performed on the 20–30th day of the development of head injury, after the end of the acute period of development of cerebrovascular pathology with the intravenous use of dexmedetomidine with an initial IV infusion rate of 0.66–1.11 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ for 180 minutes (total 200 μg , 0.01% – 2.0 ml). Then the intravenous infusion of dexmedetomidine was carried out at a rate of 0.14–0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ for 24 hours (total 400 μg , 0.01% – 4.0 ml). The dosages of the pharmacodynamic test correspond to the dosages of the State Register of Medicines. The pharmacodynamic test recorded the functional activity of the autonomic nervous system (ANS) according to the parameters of the heart rate variability (HRV) initially, after 90, 180 minutes and after 24 hours from the start of the drug use. Patients with a permanent form of atrial fibrillation were excluded from

the study. The criterion for starting the infusion of dexmedetomidine (Orion Pharma, Finland) was the electrophysiological indicators of HRV characteristic of sympathetic hyperactivity (5-minute recordings of RR intervals were used). HRV parameters were recorded initially, at the 90th and 180th minutes of application, and 24 hours after the start of the drug infusion. Sympathetic hyperactivity was taken within the values for SDNN <4.54 ms; for RMSSD <2.25 ms; for pNN50% <0.109%; for TP <200 ms². To verify sympathetic hyperactivity, norm or parasympathetic hyperactivity, at least 3 out of 4 HRV parameters must be within the specified limits. Blood serum parameters were recorded at baseline and 24 hours after the start of the drug administration TNF- α , IL-6, cortisol, free myoglobin, C-reactive protein, procalcitonin, subclasses of T-lymphocytes CD (3) (+) – mature lymphocytes, CD (4) (+) – T-helpers, CD (8) (+) – T-lymphocytes, CD (4) (+) / CD (8) (+); CD (16) (+) killers.

Results. Dexmedetomidine shows the elimination of sympathetic hyperactivity (HRV parameters: SDNN, RMSSD, pNN50%, TP), reduces the level of pro-inflammatory blood cytokines (TNF- α , IL-6), markers of systemic inflammation (procalcitonin, C-reactive protein), reduces the concentration of stress hormone of the adrenal cortex (cortisol) and tissue hypoxia (free myoglobin). Dexmedetomidine simulates T and B cell immunity by decreasing the excessive cytotoxic function of lymphocytes.

Conclusion. Dexmedetomidine in a clinical pharmacodynamic test normalizes the neuroendocrine response and homeostasis of the body.

Keywords: pharmacodynamic test, heart rate variability, dexmedetomidine, myoglobin, cortisol, procalcitonin

■ ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза при остром и хроническом критическом состоянии обеспечивается взаимодействием автономной нервной, гормональной и иммунной систем [1, 2]. Адаптационный ответ организма проявляется балансом возникающих клинических синдромов, важнейшими из которых являются синдром системного воспалительного ответа – ССВО (SIRS – systemic inflammatory response syndrome), компенсаторный противовоспалительный ответный синдром (CARS – the compensatory anti-inflammatory response syndrome), синдром высвобождения цитокинов (CRS – cytokine release syndrome), активация холинергического противовоспалительного пути (cholinergic anti-inflammatory pathway – CAP), синдром стойкого воспаления-иммуносупрессии и катаболизма (persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome – PICS) [3, 4]. Каскад возникающих при данных синдромах реакций приводит (либо не приводит) к появлению изолированной (single-organ respiratory failure – acute respiratory distress syndrome, ARDS) или множественной органной недостаточности (мультисистемная недостаточность органов – multiple organ failure (MOF)). Очевидно, что необходимым элементом оценки эффективности интенсивной терапии является фармакодинамическое тестирование того или иного метода лекарственной терапии исходя из анализа параметров, составляющих стресс-ответ организма [5–8].



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода фармакодинамической оценки эффективности дексмететомидина на основе одновременного мониторинга функциональных параметров автономной нервной, гормональной и иммунологической реактивности у пациентов при интенсивной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 16 пациентов (мужчин – 13, женщин – 3, средний возраст – $49,25 \pm 5,02$ года) в период более 21 суток с последствиями черепно-мозговой травмы (ЧМТ) ($n=2$), острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) ($n=11$), аноксического повреждения головного мозга ($n=1$), субарахноидального кровоизлияния ($n=2$). В исследование включены пациенты с показателями симпатической гиперактивности по данным анализа вариабельности ритма сердца; возраст от 18 лет. Критериями исключения являлись: острый период повреждения головного мозга, кардиогенный шок, постоянная форма фибрилляции предсердий.

Фармакодинамический тест внутривенного введения дексмететомидина выполнен на 21–30-е сутки интенсивной терапии и развития повреждения головного мозга. Начальная скорость в/в инфузии лекарственного препарата составила $0,66\text{--}1,11$ мкг/кг/ч в течение 180 минут (суммарно 200 мкг, 0,01% – 2,0 мл). Затем в/в инфузия дексмететомидина проводилась со скоростью введения $0,14\text{--}0,28$ мкг/кг/ч в течение 24 часов (суммарно 400 мкг, 0,01% – 4,0 мл). Дозировки фармакодинамического теста соответствуют дозам Государственного реестра лекарственных средств. Электрофизиологические и лабораторные показатели крови фиксировались исходно, через 90 минут, 180 минут и 24 часа от момента начала инфузии препарата. При фармакодинамическом тесте регистрировали:

- 1) функциональную активность АНС по параметрам вариабельности ритма сердца (BPC), для чего использовались 5-минутные записи кардиоинтервалов (прибор Полиспектр-8 EX, фирма «Нейрософт», Россия). Регистрировали следующие показатели BPC: SI – стресс-индекс Баевского (индекс напряжения) в нормализованных единицах (н. е.); SDNN – среднеквадратичное отклонение R-R кардиоинтервалов в мс; rMSSD – среднеквадратичное отклонение разности двух смежных отсчетов R-R кардиоинтервалов в мс; pNN50% – доля R-R кардиоинтервалов в процентах, отличающихся от предыдущего более чем на 50 мс; TP – общая мощность спектра частот в мс^2 .

Критерием начала инфузии препарата дексмететомидина (фирма Orion Pharma, Финляндия) служили электрофизиологические показатели BPC, характерные для симпатической гиперреактивности.

О симпатической гиперактивности судили по значениям для SDNN $<4,54$ мс, для RMSSD $<2,25$ мс, для pNN50% $<0,109\%$, для SI >900 н. е. (нормализованные ед.), для TP <200 мс^2 . Норма параметров BPC принималась в пределах значений для SDNN [13,31–41,4 мс], для RMSSD [5,78–42,3 мс], для pNN50% [0,110–8,1%], для SI [80–900 н. е.], для TP [200–2000 мс^2]. Парасимпатическая гиперактивность принималась в пределах значений для SDNN $>41,5$ мс, для RMSSD $>42,4$ мс, для pNN50% $>8,1\%$, для SI <80 н. е., для TP >2000 мс^2 . Для верификации симпатической гиперактивности, нормы или парасимпатической гиперактивности в указанных пределах должны быть как минимум 3 из 5 параметров BPC;

- 2) показатели провоспалительной цитокиновой активности сыворотки крови (TNF- α , IL-6) – с использованием иммунохимической системы IMMULITE 2000XPi (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия);
- 3) концентрацию в сыворотке крови кортизола, прокальцитонина, миоглобина – на автоматическом иммунофлуоресцентном анализаторе Vidas (bioMerieux SA, Био-Мерье, Франция);
- 4) оценка субпопуляционного спектра (дисбаланса) лимфоцитов включала в себя определение исходно и через 24 часа применения препарата содержания подклассов Т-лимфоцитов: CD(3)(+) – зрелые лимфоциты, CD(4)(+)– Т-хелперы, CD(8)(+) – Т-лимфоциты, обладающие супрессорно-цитотоксическими свойствами, CD(4)(+)/CD(8)(+), CD(16)(+) киллеры – на проточном цитофлуориметре CyFlow Space (Partec, Германия);
- 5) концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови определяли исходно и через 24 часа применения препарата на биохимическом анализаторе Advia 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программы MedCalc Software, версия 18.10.2. Достоверными признавались различия при $p \leq 0,05$. «Нулевая» гипотеза оценивалась с применением анализа дисперсий выборок (Anova-analysis of variance). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием t-критерия Стьюдента, регрессионно-корреляционного анализа.

Исследование выполнено согласно Хельсинкской декларации и основам законодательства Республики Беларусь и Российской Федерации об охране здоровья граждан; одобрено комитетом по биомедицинской этике и деонтологии Центральной городской больницы имени М.П. Кончаловского.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все пациенты, включенные в проведение фармакодинамического теста по данным электрофизиологического мониторинга ВРС, имели показатели, характерные для симпатической гиперактивности. Данные, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 1–3. Очевидно, что дексмететомидин вызывает снижение симпатической активности: отмечены рост $rNN50\%$, $SDNN$, $rMSSD$, TP и снижение SI . Эффекты симпатической ингибции, вызываемой дексмететомидином, носят возрастающий по времени характер, максимальные изменения (уменьшение) активности симпатического звена АНС наблюдались через 24 часа после начала инфузии препарата. Симпатолитическая терапия дексмететомидина изменяет показатели маркеров воспаления в сыворотке крови – С-реактивного белка, прокальцитонина, IL-6, TNF- α , значение которого было достоверно снижено относительно исходного при 24-часовой постоянной инфузии дексмететомидина (табл. 2). Кроме того, достоверно ниже от исходных при 24-часовой постоянной внутривенной инфузии дексмететомидина концентрации в крови гормона коры надпочечников кортизола и уровень свободного миоглобина (табл. 2). С-реактивный белок крови – реактивный белок – относится к белкам острой фазы воспаления, и его снижение является благоприятным прогностическим фактором в оценке воспаления [9]. Уровень прокальцитонина (ПКТ) увеличивается при тяжелых бактериальных инфекциях и сепсисе вследствие возрастания синтеза ПКТ не только в щитовидной железе, но и вне данного



анатомического органа: снижение концентрации его служит маркером улучшения исхода заболевания [10]. TNF – цитокин, избыточная продукция которого вызывает расстройства гемодинамики (снижает сократимость миокарда, минутный объем крови, диффузно увеличивает проницаемость капилляров) [11]. Уменьшение концентрации IL-6 указывает на снижение индукции белков острой фазы воспаления [12]. Снижение

Таблица 1

Динамика показателей временного и спектрального анализа международных единиц variability ритма сердца при проведении фармакодинамического теста с внутривенной постоянной инфузией дексмететомидина ($X \pm Sx$)

Table 1

Dynamics of indicators of temporal and spectral analysis of international units of heart rate variability during a pharmacodynamic test with intravenous continuous infusion of dexmedetomidine ($X \pm Sx$)

Параметры ВРС	Период применения дексмететомидина			
	Исходно	90 минут	180 минут	24 часа
SDNN, ms	7,63±1,4	16,6±3,2*	23±4,64*	28,2±5,72*
RMSSD, ms	4,63±0,7	17,8±5,62*	12,2±3,6*	10,1±1,56**
pNN50%	0,02±0,01	0,3±0,13	2,27±1,6	6,47±0,16
SI (стресс-индекс), норм. ед.	2313±617	1233±561	596,7±157,1*	381,7±66,1**
TP, ms ²	84,7±19,3	343,9±89,8*	886±65,7***	1349,8±530,6*

Примечания: SDNN – среднееквадратичное отклонение R-R кардиоинтервалов в мс; rMSSD – среднееквадратичное отклонение разности двух смежных отсчетов R-R кардиоинтервалов в мс; pNN50% – доля R-R кардиоинтервалов в процентах, отличающихся от предыдущего более чем на 50 мс; SI – стрессовый индекс Баевского в норм. единицах; TP – общая мощность спектра частот (total power spectrum – TP), мс²; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; отличие параметра от исходного уровня (до начала применения дексмететомидина) по t-тесту или дисперсионному анализу.

Таблица 2

Некоторые гематологические и биохимические данные лабораторного исследования крови пациентов с проведением фармакодинамического теста с внутривенной постоянной инфузией дексмететомидина ($X \pm Sx$)

Table 2

Some hematological, biochemical data in a group of patients with a pharmacodynamic test with intravenous continuous infusion of dexmedetomidine ($X \pm Sx$)

Показатель	Период применения дексмететомидина	
	Исходно	24 часа
C-реактивный белок крови (СРБ), мг/л	224,64±40,2 [40; 393]	140,54±27,5* [27; 205]
Прокальцитонин, мкг/л	1,62±0,42 [0,11; 1,01]	1,25±0,31* [0,13; 0,83]
Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α), нг/л	13,7±1,91 [8,9; 13,3]	6,9±0,61** [6,9; 9,7]
Интерлейкин 6, нг/л	126,1±30,4 [24,49; 111,6]	44,7±8,1* [18,64; 70,78]
Кортизол, нмоль/л	728,1±32,1 [619,03; 837,29]	563,7±22,7*** [501; 626,535]
Миоглобин, мкг/л	687,7±13,5 [300,4; 313,6]	541,5±31,6*** [132,1; 568,1]

Примечания: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 отличие параметра от исходного уровня (до начала применения дексмететомидина) по t-тесту или дисперсионному анализу. В скобках – квантили показателей (Q1; Q3).

секреции кортизола указывает на уменьшение действия стрессовых факторов (инфекция, травма, мультиорганная недостаточность и т. д.) [13, 14]. Снижение уровня свободного миоглобина – кислородсвязывающего белка скелетных мышц – указывает на уменьшение степени кислородного долга и гиперпродукции цитокинов [15–17]. При 24-часовой инфузии дексмететомидина достоверно ниже от исходных значений абсолютное и относительное содержание Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), Т-хелперов (CD3+CD4+), абсолютное содержание Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+), В-лимфоцитов (CD-CD19+), NK-клеток общих (CD3-CD16+CD56+) (табл. 3). Динамика подклассов лимфоцитов указывает на снижение избыточной иммунной активации под действием внутривенного введения дексмететомидина.

Применение дексмететомидина под контролем чувствительного индикатора функционального состояния АНС в виде электрофизиологической оценки ВРС имеет высокие перспективы точной навигации и оптимальной стратегии выбора дозы данного лекарственного препарата в интенсивной терапии [18–21]. Нейроэндокринная и иммунная дисрегуляция может приводить к цитокиновому шторму и способствовать развитию синдрома токсического шока [22–25]. Возникающая при этом полиорганная недостаточность остается главным фактором критического состояния,

Таблица 3
Иммунологические данные в группе пациентов с проведением фармакодинамического теста с внутривенной постоянной инфузией дексмететомидина (X±Sx)
Table 3
Immunological data in a group of patients with a pharmacodynamic test with intravenous continuous infusion of dexmedetomidine (X±Sx)

Показатель	Период применения дексмететомидина	
	Исходно	24 часа
Т-лимфоциты (CD3+CD19-), %	81,5±1,36 [79; 84]	76,7±1,79* [72; 81]
Т-лимфоциты (CD3+CD19-), 10 ⁹ /л	2,41±0,24 [2,04; 2,89]	1,16±0,11** [1,01; 1,363]
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	48,9±1,94 [43; 52]	40,07±2,56* [32; 46]
Т-хелперы (CD3+CD4+), 10 ⁹ /л	1,46±0,21 [1,07; 1,48]	0,58±0,05** [0,35; 0,74]
Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+), %	31,8±3,12 [19; 41]	33,8±4,28 [18; 46]
Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+), 10 ⁹ /л	0,92±0,1 [0,92; 1,04]	0,55±0,09* [0,307; 0,673]
Иммунорегуляторный индекс (Т-хелперы/Т-цитотоксические) (CD3+CD4+/CD3+CD8+)	1,81±0,26 [1,07; 2,73]	1,63±0,32 [0,696; 2,556]
В-лимфоциты (CD-CD19+), %	10±1,52 [5; 12]	12,6±1,96 [5; 18]
В-лимфоциты (CD-CD19+), 10 ⁹ /л	0,28±0,05 [0,138; 0,285]	0,17±0,03* [0,116; 0,212]
NK-клетки общие (CD3-CD16+CD56+), %	8,1±0,61 [6; 11]	9,3±0,41 [8; 11]
NK-клетки общие (CD3-CD16+CD56+), 10 ⁹ /л	0,228±0,02 [0,138; 0,293]	0,159±0,02* [0,09; 0,212]

Примечания: * p<0,05; ** p<0,001 отличие параметра от исходного уровня (до начала применения дексмететомидина) по t-тесту или дисперсионному анализу. В скобках – квартили показателей (Q1; Q3).



определяет летальность и ресурсоемкость для здравоохранения [26–28]. Оценка изменений параметров, одновременно отражающих изменения нейроэндокринной регуляции, иммунных показателей, концентрации цитокинов, белков воспаления на фоне инфузии лекарственного препарата, позволяет получать таргетированный подход к использованию того или иного метода медикаментозного воздействия при интенсивной терапии.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многокомпонентный анализ компьютерного анализа вариабельности сердечного ритма, динамики концентрации кортизола, уровня провоспалительных цитокинов, маркеров системного воспаления, клеточного иммунитета сыворотки крови при фармакодинамическом исследовании позволяет оценить эффективность дексмететомидина с позиций адаптационного ответа организма. Лекарственный препарат устраняет симпатическую гиперактивность, снижает уровень провоспалительных цитокинов крови, маркеров системного воспаления, выброс стресс-гормонов коры надпочечников, тканевую гипоксию и избыточную цитотоксическую функцию лимфоцитов. Навигационными параметрами для пролонгированного внутривенного применения дексмететомидина являются цифровые параметры вариабельности ритма сердца, концентрация в крови TNF- α , IL-6, кортизола, свободного миоглобина, C-реактивного белка, прокальцитонина, подклассов лимфоцитов. Разработанный диапазон электрофизиологической и лабораторной оценки лекарственного препарата позволяет выделять пациентов для таргетированного применения дексмететомидина, подбирать дозу препарата и контролировать важнейшие гомеостатические показатели у пациентов с повреждениями головного мозга различной этиологии и при интенсивной терапии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kim M.H., Lee K.Y., Bae S.J. Intraoperative dexmedetomidine attenuates stress responses in patients undergoing major spine surgery. *Minerva Anesthesiol.* 2019;85(5):468–477. doi: 10.23736/S0375-9393.18.12992-0
2. Sladek C.D., Michellini L.C., Stachenfeld N.S. Endocrine-Autonomic Linkages. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1281–1323. doi: 10.1002/cphy.c140028
3. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E. Post injury Inflammation and Organ Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2017;33(1):167–191. doi: 10.1016/j.ccc.2016.08.006
4. Hawkins R.B., Raymond S.L., Stortz J.A. Chronic Critical Illness and the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome. *Front Immunol.* 2018;9:1511. doi: 10.3389/fimmu.2018.01511
5. Ray A., Gulati K., Rai N. Stress, Anxiety, and Immunomodulation: A Pharmacological Analysis. *Vitam Horm.* 2017;103:1–25. doi: 10.1016/bs.vh.2016.09.007
6. Wehrwein E.A., Orer H.S., Barman S.M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol.* 2016;6(3):1239–1278. doi: 10.1002/cphy.c150037
7. Paton J.F. Autonomic and neuroendocrine dysfunction in chronic disease. *J Physiol.* 2016;594(6):1579–1580. doi: 10.1113/JP271868
8. Tonhajzerova I., Mestanik M. New perspectives in the model of stress response. *Physiol Res.* 2017;66(Suppl 2):S173–S185. doi: 10.33549/physiolres.933674
9. Saeed K., Wilson D.C., Bloos F. The early identification of disease progression in patients with suspected infection presenting to the emergency department: a multi-centre derivation and validation study [published correction appears in Crit Care. 2019 Jul 15;23(1):255]. *Crit Care.* 2019;23(1):40. doi: 10.1186/s13054-019-2329-5
10. Choi J.J., McCarthy M.W. Novel applications for serum procalcitonin testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(1):27–34. doi: 10.1080/14737159.2018.1407244
11. Roy U. Structural modeling of tumor necrosis factor: A protein of immunological importance. *Biotechnol Appl Biochem.* 2017;64(4):454–463. doi: 10.1002/bab.1523
12. Shimazui T., Matsumura Y., Nakada T.A., Oda S. Serum levels of interleukin-6 may predict organ dysfunction earlier than SOFA score. *Acute Med Surg.* 2017;4(3):255–261. doi: 10.1002/ams2.263
13. Khoo B., Boshier P.R., Freethy A. Redefining the stress cortisol response to surgery. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;87(5):451–458. doi: 10.1111/cen.13439

14. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav.* 2019;199:229–243. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.11.021
15. Traa W.A., Strijkers G.J., Bader D.L., Oomens C.W. Myoglobin and troponin concentrations are increased in early stage deep tissue injury. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;92:50–57. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.12.026
16. Postnikova G.B., Shekhovtsova E.A. Myoglobin: Oxygen Depot or Oxygen Transporter to Mitochondria? A Novel Mechanism of Myoglobin Deoxygenation in Cells (review). *Biochemistry (Mosc).* 2018;83(2):168–183. doi: 10.1134/S0006297918020098
17. Yanagisawa O., Fukutani A. Effects of low-load resistance exercise with blood flow restriction on intramuscular hemodynamics, oxygenation level and water content. *J Sports Med Phys Fitness.* 2018;58(6):793–801. doi: 10.23736/S0022-4707.17.07463-1
18. Dardalas I., Stamoula E., Rigopoulos P. Dexmedetomidine effects in different experimental sepsis in vivo models. *Eur J Pharmacol.* 2019;856:172401. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.05.030
19. Raue J.F., Tarvainen M.P., Kästner S.B. Experimental study on the effects of isoflurane with and without remifentanyl or dexmedetomidine on heart rate variability before and after nociceptive stimulation at different MAC multiples in cats. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):258. doi: 10.1186/s12917-019-2004-8
20. Cho J.S., Kim S.H., Shin S. Effects of Dexmedetomidine on Changes in Heart Rate Variability and Hemodynamics During Tracheal Intubation. *Am J Ther.* 2016;23(2):e369–76. doi: 10.1097/MJT.0000000000000074
21. Ye L., Dai B., Wu Z., Hu Y. Dynamics of heart rate variability in patients with type 2 diabetes mellitus during spinal anesthesia using dexmedetomidine. *Am J Transl Res.* 2021;15(5):5395–5403.
22. Cavaillon J.M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicol.* 2018;149:45–53. doi: 10.1016/j.toxicol.2017.10.016
23. Masuda K., Kishimoto T. A Potential Therapeutic Target RNA-binding Protein, Arid5a for the Treatment of Inflammatory Disease Associated with Aberrant Cytokine Expression. *Curr Pharm Des.* 2018;24(16):1766–1771. doi: 10.2174/1381612824666180426103753
24. Gupta K.K., Khan M.A., Singh S.K. Constitutive Inflammatory Cytokine Storm: A Major Threat to Human Health. *J Interferon Cytokine Res.* 2020;40(1):19–23. doi: 10.1089/jir.2019.0085
25. Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):517–528. doi: 10.1007/s00281-017-0639-88
26. Hesselink L., Hoepelman R.J., Spijkerman R. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS) after Polytrauma: A Rare Syndrome with Major Consequences. *J Clin Med.* 2020;9(1):191. doi: 10.3390/jcm9010191
27. Osuchowski M.F., Thiernemann C., Remick D.G. Sepsis-3 on the Block: What Does It Mean for Preclinical Sepsis Modeling? *Shock.* 2017;47(5):658–660. doi: 10.1097/SHK.0000000000000775
28. Assinger A., Schrottmaier W.C., Salzmann M., Rayes J. Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data. *Front Immunol.* 2019;10:1687. doi: 10.3389/fimmu.2019.01687



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.014>
УДК 577.112.385.2:616.12-008.331.1]-074-053.2



Лукша А.В.¹✉, Максимович Н.А.¹, Гуляй И.Э.¹, Шулика В.Р.¹, Глазев А.А.², Клиса С.Д.², Козич А.А.³

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

³ Гродненская областная детская клиническая больница, Гродно, Беларусь

Методология оценки NO-синтазной активности эндотелия сосудов детей с артериальной гипертензией

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования, редактирование – Максимович Н.А.; дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста, редактирование – Лукша А.В.; обработка, редактирование – Гуляй И.Э., Шулика В.Р., Глазев А.А., Клиса С.Д., Козич А.А.

Подана: 31.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: drluksha@mail.ru

Резюме

Цель. Оценить NO-синтазную активность эндотелия сосудов путем определения плазменного уровня аргинина, eNOS и NOx у детей с артериальной гипертензией.

Материалы и методы. Обследовано 111 детей в возрасте от 14 до 18 лет, из них мальчиков – 77 (69,4%), девочек – 34 (30,6%). Медиана возраста обследуемых пациентов была равна 15,2 года (14,0–16,5). Все пациенты были разделены на 3 группы: 1-ю группу (n=51) составили дети с артериальной гипертензией, 2-ю группу (n=30) – дети с высоким нормальным артериальным давлением, 3-ю группу – 30 здоровых детей из групп периодического диспансерного наблюдения.

Результаты. Установлено, что уровень аргинина у детей с артериальной гипертензией выше по сравнению с таковым в группе контроля (p=0,02). Группа детей с артериальной гипертензией характеризовалась более низкими значениями концентрации eNOS и NOx по сравнению с группой здоровых детей (p=0,03, p=0,04 соответственно).

Выводы. У детей с артериальной гипертензией выявляются нарушения в системе L-аргинин-NO, характеризующиеся снижением синтеза NO вследствие низкой активности эндотелиальной синтазы оксида азота.

Ключевые слова: оксид азота, эндотелиальная синтаза оксида азота, L-аргинин, артериальная гипертензия, дети

Aliaksandr V. Luksha¹✉, Mikalai A. Maximovich¹, Irina E. Gulyai¹, Valentina R. Shulika¹, Anton A. Glazev², Sergey D. Klisa², Aliaksandr A. Kozich³

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

³ Grodno Regional Children's Clinical Hospital, Grodno, Belarus

Methodology for Assessing the NO-synthase Activity of the Vascular Endothelium in Children with Arterial Hypertension

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design of the study, editing – Mikalai A. Maximovich; design of the study, collection of material, processing, writing a text, editing – Aliaksandr V. Luksha; processing, editing – Irina E. Gulyai, Valentina R. Shulika, Anton A. Glazev, Sergey D. Klisa, Aliaksandr A. Kozich.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: drluksha@mail.ru

Abstract

Purpose. To evaluate the NO-synthase activity of the endothelium by determining the plasma level of arginine, eNOS and NOx in children with arterial hypertension.

Materials and methods. 111 children aged 14 to 18 years were examined, including: 77 boys (69.4%), 34 girls (30.6%). The median age of the examined patients was 15.2 years (14.0–16.5). All patients were divided into 3 groups: the first group (n=51) consisted of children with arterial hypertension, the 2nd group (n=30) – with high normal blood pressure, the 3rd group – 30 healthy children.

Results. It was found that the level of arginine in children with arterial hypertension is higher compared to the control group (p=0.02). The group of children with arterial hypertension was characterized by lower concentrations of eNOS and NOx compared to the group of healthy children (p=0.03, p=0.04, respectively).

Conclusions. In children with arterial hypertension, disturbances in the L-arginine-NO system are revealed, characterized by a decrease in NO synthesis due to low activity of endothelial nitric oxide synthase.

Keywords: nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, L-arginine, arterial hypertension, children

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время функциональному состоянию эндотелия придается большое значение при изучении этиологии, патогенеза и прогрессирования артериальной гипертензии. Одним из основных вазоактивных метаболитов, определяющих регуляцию сосудистого тонуса, является эндотелиальный фактор релаксации – оксид азота (NO) [1–3]. Известно, что NO непрерывно продуцируется ферментативным путем и выполняет функции универсального мессенджера внутри- и межклеточной сигнализации [4].



NO представляет собой восстановленную форму монооксида азота с периодом полураспада от 2 до 30 секунд, которая образуется посредством окисления терминальной группы гуанидина аминокислоты L-аргинина [1, 3]. Считают, что без участия L-аргинина невозможна системная и локальная регуляция тонуса гладкомышечного слоя стенки сосудов [5].

L-аргинин является основным субстратом для синтазы оксида азота (NOS), которая продуцирует NO [6, 7]. В настоящее время идентифицированы три изоформы NOS: NOS-1 – нейрональная (nNOS) или мозговая (bNOS), NOS-2 – индуцибельная (iNOS) или макрофагальная (mNOS) и NOS-3 – эндотелиальная (eNOS) [3, 7]. Две изоформы (nNOS и mNOS) локализованы главным образом в цитоплазме клеток, eNOS содержится в мембранах клетки. Все изоформы NOS катализируют образование NO, имеют сходную структуру, однако механизм действия, локализация каждой изоформы и биологический эффект имеют специфические особенности [7–9]. Известны научные данные о существовании четвертой изоформы – митохондриальной NOS (mtNOS), убедительно подтверждающие участие митохондрий в продукции NO [7, 10].

В норме образование NO происходит в основном с участием eNOS (nNOS продуцируют NO в очень малых количествах) [11]. Функциональная роль eNOS и ее способность синтезировать NO определяется как уровнем экспрессии самого фермента в тканях, так и процессами, приводящими к изменению ее активности. При эндотелиальной дисфункции отмечается нарушение синтеза и биодоступности NO вследствие подавления экспрессии/инактивации eNOS, уменьшения уровня L-аргинина, кофакторов NO-синтазы, повышения содержания эндогенных ингибиторов NO или из-за повышенного распада NO активными формами кислорода [10, 12, 13]. Поэтому изменение плазменной концентрации основных компонентов системы L-аргинин-NO может выступать в качестве раннего биохимического маркера сосудистого повреждения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить NO-синтазную активность эндотелия сосудов путем определения плазменного уровня аргинина, eNOS и NOx у детей с артериальной гипертензией.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 111 детей в возрасте от 14 до 18 лет, из них мальчиков – 77 (69,4%), девочек – 34 (30,6%). Медиана возраста обследуемых пациентов была равна 15,2 года (14,0–16,5). Все пациенты были разделены на 3 группы: 1-ю группу (n=51) составили дети с артериальной гипертензией, 2-ю группу (n=30) – дети с высоким нормальным артериальным давлением, 3-ю группу – 30 здоровых детей из групп периодического диспансерного наблюдения.

Содержание аргинина в плазме крови определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией [14].

Количественное определение уровня эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в плазме крови проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа Human NOS3/eNOS (Nitric oxide synthase, endothelial) ELISA Kit cat. № EH0554.

Концентрацию стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов, NOx) в плазме крови определяли с помощью реактива Грисса [15].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Количественные данные, распределение которых не являлось нормальным, представлялись в виде медианы (Me), нижнего (Q25) и верхнего (Q75) квартилей. Для оценки различий количественных признаков применялись непараметрические методы статистического анализа. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении аргинина в плазме крови медиана уровня данной аминокислоты у пациентов группы 1 составила 78,26 (57,30; 90,55) мкмоль/л, в группе 2 – 71,61 (50,00; 89,48) мкмоль/л, среди здоровых детей – 65,48 (49,67; 77,88) мкмоль/л (рис. 1).

Установлено, что у детей с артериальной гипертензией уровень аргинина был статистически выше по сравнению со здоровыми детьми ($p=0,02$). Группа 1 и группа 2, как группа 2 и группа 3, по концентрации аргинина статистически не различались ($p>0,05$). Полагаем, что повышение содержания аргинина у детей с артериальной гипертензией в нашем исследовании можно объяснить наличием у них гипергомоцистеинемии, которая подавляет активность основного катализатора – eNOS, тем самым нарушает биодоступность аргинина для синтеза NO.

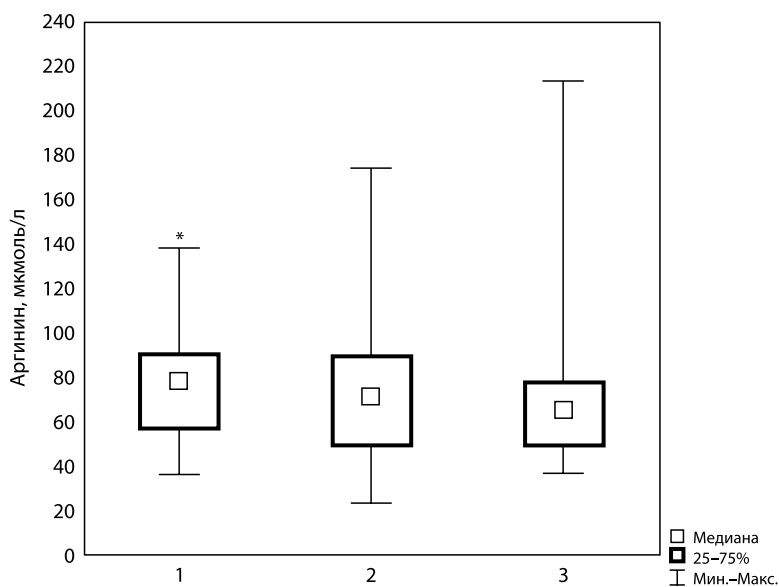


Рис. 1. Уровень аргинина в плазме крови обследованных детей

Примечание: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 ($p=0,02$).

Fig. 1. Level of arginine in blood plasma of examined children

Note: * statistically significant differences between group 1 and group 3 ($p=0,02$).

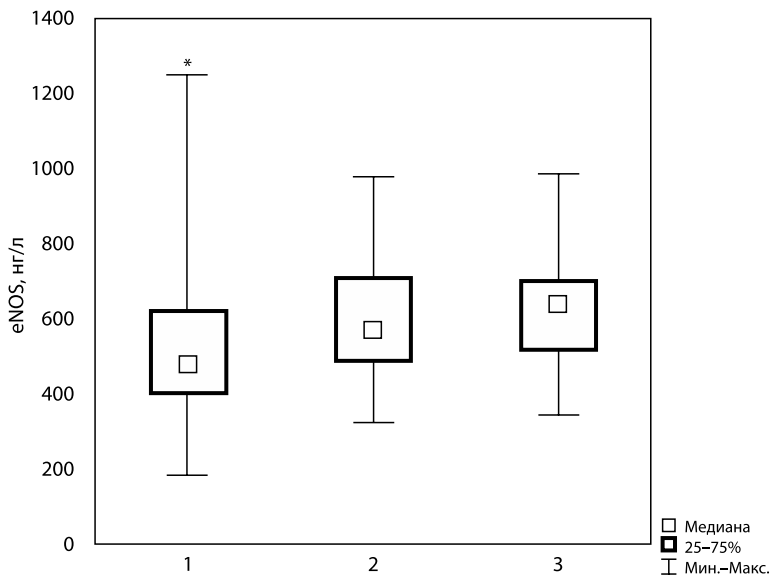


Рис. 2. Уровень eNOS в плазме крови обследованных детей

Примечание: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 (p=0,03).

Fig. 2. Level of eNOS in blood plasma of examined children

Note: * statistically significant differences between group 1 and group 3 (p=0.03).

При определении активности eNOS в плазме крови установлено, что медиана eNOS у детей группы 1 составила 480,28 (400,0; 617,93) нг/л, в группе 2 – 569,79 (492,96; 709,39) нг/л, среди здоровых детей – 638,38 (516,89; 700,96) нг/л (рис. 2).

У детей с эссенциальной артериальной гипертензией уровень eNOS характеризовался более низкими значениями по сравнению с группой здоровых детей (p=0,03). Группа 1 и группа 2, как группа 2 и группа 3, по концентрации eNOS статистически не различались (p>0,05).

Уровень стабильных метаболитов оксида азота у детей с артериальной гипертензией составил 20,25 (16,87; 22,30) мкмоль/л, в группе детей с высоким нормальным артериальным давлением – 18,12 (15,62; 20,98) мкмоль/л, среди здоровых детей – 21,39 (18,03; 26,89) мкмоль/л (рис. 3). При сравнительном анализе содержания плазменного уровня NOx у пациентов в зависимости от сформированных групп установлены статистически значимые различия между группой здоровых детей и пациентами с артериальной гипертензией (p=0,04) и между группой сравнения и группой детей с высоким нормальным артериальным давлением (p=0,004). Достоверных различий между пациентами 1-й и 2-й группы выявлено не было.

Следует отметить, что среди обследованных детей с артериальной гипертензией и высоким нормальным артериальным давлением уровень NOx в плазме крови был достоверно ниже по сравнению с таковым в группе контроля, что может указывать

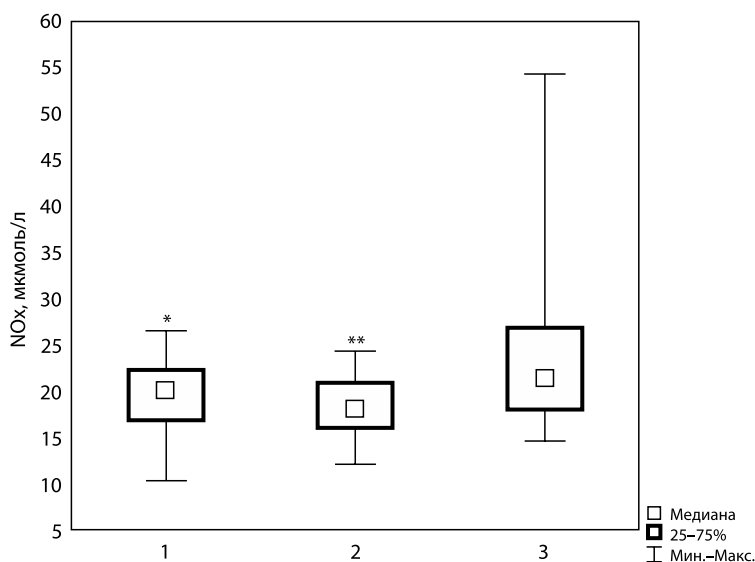


Рис. 3. Уровень стабильных метаболитов NO в плазме крови обследованных детей

Примечания: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 ($p=0,04$); ** статистически значимые различия между группой 2 и группой 3 ($p=0,004$).

Fig. 3. Level of stable NO metabolites in blood plasma of examined children

Notes: * statistically significant differences between group 1 and group 3 ($p=0.04$); ** statistically significant differences between group 2 and group 3 ($p=0.004$).

на падение продукции эндотелиального NO и усугублять дисфункцию эндотелия. Полагаем, что эти изменения в метаболизме NO являются одним из главных механизмов формирования повышенного артериального давления у детей.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Группа детей с артериальной гипертензией характеризовалась повышенным уровнем аргинина в плазме крови по сравнению с таковым в группе сравнения.
2. Активность эндотелиальной синтазы оксида азота и уровень стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови у детей с артериальной гипертензией характеризовались более низкими значениями по сравнению с аналогичными значениями в группе здоровых детей, что может указывать на падение продукции эндотелиального NO.
3. У детей с артериальной гипертензией выявлены нарушения в системе L-аргинин-NO, характеризующиеся снижением синтеза NO вследствие низкой активности эндотелиальной синтазы оксида азота.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83–94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002
2. Maltseva N.V., Smirnova A.S., Rublevskaya A.C., Bichan N.A. Possible genetically determined mechanisms of arterial hypertension in tobacco smoking. *Kardiologiya.* 2019;59(15):4–10. (in Russian)
3. Belovol A.N., Knyazkova I.I. Endothelial function: focus on nitric oxide. *Health of Ukraine.* 2012;50–51. (in Russian)
4. Kazak M.E., Zinchuk V.V., Gulyai I.E. Participation of the L-arginine-NO system in adaptive processes in chronic oxidative stress. *Military medicine.* 2014;4:77–78. (in Russian)
5. Sokolova L.K., Pushkarev V.M., Tronko M.D. L-arginine in norm and pathology. *Endocrinology.* 2019;24(4):373–386. (in Russian)
6. Morris S.M. Jr. Arginine metabolism revisited. *J Nutr.* 2016;146(12):2579S–86S. doi: 10.3945/jn.115.226621
7. Luksha A.V., Maximovich N.A. State of vasomotor function of the endothelium in children with arterial hypertension. *Pediatrics. Eastern Europe.* 2022;10(4):489–499. (in Russian)
8. Goncharov N.P. Nitric oxide (NO): physiology and metabolism (lecture). *Andrology and Genital Surgery.* 2020;21(3):75–79. doi: 10.17650/2070-9781-2020-21-3-75-79
9. Kuznetsova V.L., Soloveva A.G. Nitric oxide: properties, biological role, mechanisms of action. *Modern problems of science and education.* 2015;4:24–29. (in Russian)
10. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(4):190–195. doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005
11. Luksha A.V., Maximovich N.A., Harchakova V.V., Gulyai I.E., Shulika V.R. Effect of the polymorphisms 894G/T and T786C of the endothelial nitric oxide synthase gene on the levels of their expression products – eNOS and NO in children with arterial hypertension. *Practical medicine.* 2022;20(7):46–50. (in Russian)
12. Vasina L.V., Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Markers of endothelial dysfunction. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2017;16(1):4–15. (in Russian)
13. Gumanova N.G. Nitrogen oxide and its circulating NOx metabolites, their role in human body functioning and cardiovascular death risk prediction (Part II). *Profilakticheskaya Meditsina.* 2021;24(10):119–125. (in Russian)
14. Nefyodov L.I., Glazev A.A., Doroshenko E.M. Determination of the content of free amino acids and their derivatives by high performance liquid chromatography. *MVI. MN 3201-2009.* 2009;18. (in Russian)
15. Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:645–657.



Щастный А.Т., Осочук А.С.✉, Марцинкевич А.Ф., Осочук С.С.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Изменение состава нативных липопротеинов очень низкой плотности, содержания С-пептида и глюкозы крови у пациентов с терминальной почечной недостаточностью и в ранние сроки после пересадки почки с использованием такролимуса в качестве иммунодепрессанта

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование – Щастный А.Т., Осочук С.С.; сбор и обработка материала, написание текста – Осочук А.С.; статистическая обработка данных – Марцинкевич А.Ф.

Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов. Работа выполнялась в рамках ГПНИ «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки», задание 3.37 «Изучить состояние липидтранспортной и иммунной систем пациентов с пересадкой почки и обосновать подходы к их коррекции», № госрегистрации 20220305 от 16.03.2022.

Финансирование. Финансовой поддержки со стороны компаний – производителей лекарственных препаратов авторы не получали.

Подана: 29.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: aos19950207@gmail.com

Резюме

Цель. Определить динамику изменений состава нативных липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), содержания С-пептида и глюкозы крови в периоды перед операцией пересадки почки и в ранние послеоперационные сроки как у мужчин, так и у женщин второго периода зрелого возраста, получавших комплексную терапию с применением такролимуса.

Материалы и методы. В исследуемую группу вошли 14 мужчин (36–60 лет) и 14 женщин (36–55 лет) с терминальной стадией хронической болезни почек (ХБП), прибывших в больницу для пересадки почки. Контрольная группа сформирована из 15 здоровых мужчин и 15 здоровых женщин того же возраста. Выделение ЛПОНП проводилось методом препаративного ультрацентрифугирования. Содержание белка, холестерина (ХС), триацилглицеринов (ТГ), общих фосфолипидов (ОФЛ) в ЛПОНП и глюкозы, апопротеина В (апоВ) в плазме крови определяли биохимическими методами. Концентрацию С-пептида определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. У пациентов с терминальной ХБП установлено повышение содержания ХС и ТГ ЛПОНП, уровня С-пептида крови, а также нивелирование характерных для здоровых людей гендерных отличий по содержанию апоВ в плазме крови. После операции до приема такролимуса остается повышенным содержание С-пептида, повышается уровень глюкозы, в то время как значения ХС и ТГ ЛПОНП снижаются практически до уровня контрольной группы. Через 24 часа и на 7-е сутки после операции



содержание С-пептида остается повышенным, появляются гендерные отличия в содержании ТГ и общего белка ЛПОНП, а также апоВ плазмы крови.

Выводы. У пациентов с терминальной ХБП имеются проатерогенные изменения ЛПОНП, «сглаживающиеся» непосредственно после операции и вновь возникающие через 24 часа после операции и приема такролимуса. При этом на всех этапах исследования у пациентов сохраняется повышенный уровень С-пептида плазмы крови на фоне неизменной концентрации глюкозы, что может служить маркером инсулинорезистентности.

Ключевые слова: дислиппротеинемия, ЛПОНП, такролимус, инсулинорезистентность, трансплантация почки

Anatoly T. Shchastniy, Alexander S. Osochuk✉, Alixander F. Martsinkevich,
Sergey S. Osochuk
Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Changes in the Composition of Very Low Density Native Lipoproteins, C-Peptide and Blood Glucose Contents in Patients with Terminal Kidney Failure and Early After Kidney Transplant with the Use of Takrolimus as Immunosuppressant

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, editing – Anatoly T. Shchastniy, Sergey S. Osochuk; data collection and processing, text writing – Alexander S. Osochuk; statistical data analysis – Alixander F. Martsinkevich.

Information about the source of support in the form of grants, equipment, drugs. The work was carried out within the framework of the state research program "Translational Medicine", subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science", assignment 3.37 "To study the state of the lipid transport and immune systems of patients with kidney transplantation and substantiate approaches to their correction" state registration No. 20220305 dated 16.03.2022.

Funding. The authors did not receive financial support from drug manufacturing companies.

Submitted: 29.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: aos19950207@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the dynamics of changes in the composition of native VLDL, the content of C-peptide and blood glucose in the periods before kidney transplantation and in the early postoperative periods in both men and women of the second period of mature age who received complex therapy with tacrolimus.

Materials and methods. The study group included 14 men (36–60 years old) and 14 women (36–55 years old) with end-stage chronic kidney disease (CKD) who arrived at the hospital for a kidney transplant. The control group consisted of 15 healthy men and 15 healthy women of the same age. Isolation of very low density lipoproteins (VLDL) was carried out by preparative ultracentrifugation. The content of protein, cholesterol, triacylglycerols (TAG), total phospholipids in VLDL and glucose, apoprotein B in blood plasma, was determined by biochemical methods. The concentration of the C-peptide was determined by ELISA.

Results. In patients with terminal CKD, an increase in the content of VLDL cholesterol and TAG, the level of C-peptide in blood plasma and the leveling of gender differences in the content of apoB in blood plasma, which are characteristic of healthy people, were found. After the operation, before taking tacrolimus, the content of C-peptide remains elevated and the level of glucose rises, while the values of VLDL cholesterol and TAG decrease almost to the level of the control group. After 24 hours and on the 7th day after the operation, the content of C-peptide remains elevated, gender differences appear in the content of TAG, total protein of VLDL and blood plasma apoB.

Conclusions. Patients with end-stage CKD have proatherogenic changes in VLDL, "smoothing" out immediately after surgery and reappearing 24 hours after surgery and tacrolimus. At the same time, at all stages of the study, patients maintain an elevated level of blood plasma C-peptide against the background of a constant glucose concentration, which can serve as a marker of insulin resistance.

Keywords: dyslipoproteinemia, LDL, tacrolimus, insulin resistance, kidney transplantation

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основным иммунодепрессантом, применяемым после операции пересадки почки, является такролимус, обладающий менее выраженными побочными эффектами по сравнению с циклоспорином А. Вместе с тем вызываемые им проатерогенные изменения липидтранспортной системы крови стали одним из наиболее значимых факторов выживаемости таких пациентов [1]. Известно, что на сердечно-сосудистые заболевания приходится от 35% до 50% смертей среди реципиентов почечного трансплантата [2]. В связи с проатерогенными изменениями, вызываемыми такролимусом, исследование молекулярных механизмов их реализации является высокоактуальным. Вместе с тем до настоящего времени механизмы, лежащие в основе проатерогенного действия такролимуса, не определены в полной мере. Более того, в публикациях по данному вопросу зачастую не учитываются гендерные и возрастные особенности регуляции состояния липидного обмена обследуемых пациентов, что не позволяет считать полученные результаты в полной мере отражающими состояние проблемы. Так, на кафедре урологии медицинского университета Осаки были обследованы 12 мужчин и 5 женщин в возрасте $35,2 \pm 10,9$ года после пересадки почки с использованием такролимуса в качестве иммунодепрессанта. Через месяц после пересадки почки был выявлен рост содержания ХС ЛПОНП и ХС ЛПВП2 [3]. К сожалению, в статье не нашло отражения сравнение обследованных по полу и возрасту. Gerold Thölking и соавторы [4] обследовали 96 пациентов обоего пола в возрасте от 39 до 65 лет после пересадки почки, разделив их на быстрых и медленных метаболизаторов такролимуса. Авторы сделали вывод о том, что развитие проатерогенной дислипидопроотеинемии не зависит от скорости метаболизма такролимуса. Вместе с тем, как и в предыдущей работе, авторы объединили обследуемых пациентов в группы вне зависимости от их пола и возраста, что могло послужить причиной ошибочной оценки полученных результатов. В работе [5] показано, что первичные гиперхолестеролемии, связанные с приемом такролимуса,



встречаются в 3 раза реже, чем у лиц, получавших циклоспорин А, при этом распространенность гипертриглицеридемий не имеет отличий.

Ранее нами была описана [6] дислиппротеинемия IV типа по Фредриксону (увеличение содержания ХС и ТГ ЛПОНП) [7] у пациентов с терминальной почечной недостаточностью. Известно, что резистентность к инсулину стимулирует выработку ЛПОНП в печени [8]. В то же время в литературе описано увеличение содержания инсулина и С-пептида в крови пациентов, получавших такролимус [9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить динамику изменений состава нативных ЛПОНП, содержания С-пептида, апопротеина В и глюкозы крови в периоды перед операцией пересадки почки и в ранние послеоперационные сроки как у мужчин, так и у женщин второго периода зрелого возраста [10], получавших комплексную терапию с применением такролимуса.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена в рамках ГПНИ «Трансляционная медицина», № государственной регистрации 20220305 от 16.03.2022 г.

Для проведения исследования были сформированы группы пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек, находившихся на заместительной почечной терапии (26 – гемодиализ и 2 – перитонеальный диализ). В группу обследуемых пациентов включены 14 мужчин (36–60 лет) и 14 женщин (36–55 лет) второго периода зрелого возраста [10]. Причиной хронической почечной недостаточности в 3/4 случаев был хронический гломерулонефрит с исходом в нефросклероз, в 1/4 – сахарный диабет I типа с исходом в нефропатию, поликистоз и гипертоническая болезнь с поражением почек. Анализ распределения полученных данных показал, что все исследуемые показатели находились внутри диапазонов распределения значений, характерных для пациентов с хроническим гломерулонефритом, что свидетельствует об однородности групп обследованных пациентов. В контрольную группу включены по 15 здоровых мужчин и 15 здоровых женщин той же возрастной группы. В рамках договора о сотрудничестве между Витебским государственным медицинским университетом (ВГМУ) и Минским научно-практическим центром хирургии, трансплантологии и гематологии (МНПЦХТиГ) кровь для исследований пациентов с пересадкой почки и здоровых лиц контрольной группы забирали в МНПЦХТиГ натощак в вакутайнеры с ЭДТА перед операцией пересадки почки, перед первым приемом такролимуса, через 24 часа и на 7-е сутки после операции пересадки почки. Кровь здоровых лиц группы сравнения отбирали аналогично обследуемой группе пациентов в утренние часы натощак в вакутайнеры с ЭДТА. Плазму крови замораживали при температуре жидкого азота и хранили в морозильной камере при температуре –20 °С. Замороженная плазма (без разморозки) транспортировалась во льду в ВГМУ и хранилась до обработки в морозильной камере при –20 °С. Нативные ЛПОНП выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования на ультрацентрифуге Beckman Optima LE80K (США) с использованием ротора 50.4Ti [11]. Содержание белка в нативных ЛПОНП определяли по методу Лоури [12]. Полученные результаты сопоставимы

с опубликованными ранее при исследовании нативных ЛПОНП [13]. Содержание ХС и ТГ нативных ЛПОНП и глюкозы плазмы крови определяли на спектрофлуориметре SOLAR CM 2203 (Республика Беларусь) с использованием биохимических наборов ООО «Арвитмедикл» (Республика Беларусь). В основе метода определения ХС лежит его окисление холестеролоксидазой с последующим окрашиванием в присутствии хинонимина. Определение ТГ основано на их гидролизе липазой с последующим окислением глицерофосфатоксидазой и окрашиванием в присутствии хинонимина. В основе определения содержания глюкозы лежит глюкозооксидазный метод. Содержание апопротеина В (апоВ) определяли турбидиметрическими наборами SPINREACT АРО-В (Испания) в плазме крови обследуемых. Концентрацию С-пептида определяли в плазме крови иммуноферментными наборами DiaMetra (Италия) на иммуноферментном анализаторе «Витязь Ф300ТП». Содержание общих фосфолипидов нативных ЛПОНП (ОФЛ ЛПОНП) определяли на спектрофотометре СФ46 по неорганическому фосфату [14] после минерализации в песчаной бане при температуре 180 °С.

Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ R version 4.0.5 (2021-03-31). Распределение исследуемых признаков оценивали по критерию Шапиро – Уилка, и при его соответствии Гауссовскому использовались методы параметрической статистики, при несоответствии – непараметрические методы. Парное сравнение выполняли с использованием критерия Стьюдента или критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Множественные сравнения выполняли при помощи ANOVA (в случае гетерогенности дисперсий исследуемых признаков применяли поправку Уэлча) или Н-критерия Краскела – Уоллиса. При post hoc-анализе применяли критерий Тьюки или Н-критерий Краскела – Уоллиса в модификации Дана с поправкой на множественные сравнения Бенджамини – Йекутиели. Анализ повторных измерений проводился при помощи линейных моделей со смешанными эффектами [15]. Оценка значимости отличий между уровнями фактора (период и пол) проводилась построением контрастов линейной модели [16].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка состава нативных ЛПОНП здоровых людей показала (см. таблицу), что содержание ХС ЛПОНП у женщин было на 72,7%, а апоВ плазмы крови на 38,2% ниже, чем у мужчин ($p=0,0023$, $0,0017$ соответственно). Интересно отметить, что данные по содержанию апоВ в плазме крови у мужчин и женщин аналогичны ранее опубликованной информации [17]. Возможно, выявленные отличия являются компенсаторным механизмом снижения уровня холестерина у мужчин.

Терминальная почечная недостаточность вызывала проатерогенные изменения, характерные для IV класса дислипидотеинемии (ДЛП) по Фредриксону [7]. Отмечен рост содержания ТГ нативных ЛПОНП по сравнению с группой здоровых людей ($p=0,0016$), а также увеличение содержания ХС нативных ЛПОНП по сравнению со здоровыми женщинами ($p=0,0023$). Содержание белка в ЛПОНП статистически значимо увеличилось ($p<0,001$), что свидетельствует об изменении структуры ЛПОНП. Гендерные различия по содержанию апоВ в плазме крови были нивелированы. Содержание С-пептида в плазме крови увеличивалось по сравнению со здоровыми людьми ($p<0,001$), при этом концентрация глюкозы не имела отличий. Учитывая, что концентрация глюкозы была неизменной, а содержание С-пептида



выросло, можно предположить, что проатерогенные сдвиги обусловлены ростом инсулинорезистентности, способной стимулировать продукцию ЛПОНП в печени [8]. Такая точка зрения также подтверждается способностью инсулина снижать секрецию апоВ [18], что могло стать причиной отсутствия гендерных отличий, характерных для здоровых людей.

Оценка полученных результатов показала, что после пересадки почки до назначения такролимуса количество ХС, ТГ нативных ЛПОНП статистически значимо снижалось ($p=0,009$ и $0,003$ соответственно). Количество апоВ плазмы крови было снижено по сравнению со здоровыми мужчинами ($p=0,018$) и не имело гендерных отличий. Содержание глюкозы увеличивалось как по сравнению со здоровыми людьми, так и по сравнению с предоперационным исследованием ($p=0,006$ и $0,028$ соответственно). Содержание С-пептида, как и ранее, было выше, чем у здоровых людей ($p<0,001$). Интересно отметить, что соотношение ТГ/ОФЛ ЛПОНП снижалось ($p=0,017$), что говорит об изменении физико-химических свойств ЛПОНП и возможном изменении их доступности липолитическим ферментам крови.

Таким образом, картина, характерная для IV класса ДЛП, не выявляется после операционного вмешательства, однако сохранение повышенной концентрации С-пептида и снижение содержания апоВ в плазме крови говорит о сохранении инсулинорезистентности. Возможно, выявленные позитивные изменения в липидном профиле ЛПОНП обусловлены операционным стрессом.

Через 24 часа после операции гендерные отличия в содержании ХС ЛПОНП, характерные для здоровых людей, не восстанавливаются, отмечается рост ХС ЛПОНП по сравнению со здоровыми женщинами и предыдущим сроком исследований ($p=0,006$ и $0,049$ соответственно), также увеличивается содержание ТГ и общего белка ЛПОНП как по сравнению со здоровыми людьми, так и по сравнению с предыдущим сроком исследований ($p=0,004$, $0,007$, $<0,001$, $<0,001$ соответственно). В содержании апоВ плазмы крови вновь появляются гендерные отличия, однако по сравнению со здоровыми людьми эти отличия инвертированы – содержание апоВ у мужчин становится меньше, чем у женщин ($p=0,002$), и меньше, чем у здоровых мужчин ($p=0,012$). Содержание апоВ у женщин не отличалось от такового у здоровых женщин. Сохранялось повышенное содержание С-пептида, что, как и прежде, в сочетании с неизменной концентрацией глюкозы говорит о возможном сохранении инсулинорезистентности.

Таким образом, через 24 часа после операции вновь отмечаются изменения, характерные для ДЛП IV типа по Фредриксону, обладающие менее выраженной атерогенностью, чем ДЛП II_a, для которого характерно увеличение ХС ЛПНП. Вероятнее всего, выявленные изменения обусловлены инсулинорезистентностью. Однако в отличие от терминальной почечной недостаточности содержание апоВ у мужчин и женщин реагирует по-разному. У мужчин остается сниженным, а у женщин возвращается к нормальным значениям.

На 7-е сутки после операции пересадки почки, как и в предыдущий срок исследований, отсутствуют гендерные отличия в содержании ХС нативных ЛПОНП, однако появляются отличия между мужчинами и женщинами в содержании ТГ нативных ЛПОНП. Отмечено, что у мужчин содержание ТГ ЛПОНП было статистически значимо ниже ($p=0,004$), чем у женщин. При этом и у мужчин, и у женщин содержание ТГ ЛПОНП было выше, чем у здоровых людей ($p=0,0059$ и $<0,001$ соответственно).

Изменение состава нативных липопротеинов очень низкой плотности, содержания С-пептида и глюкозы крови у пациентов с терминальной почечной недостаточностью и в ранние сроки после пересадки почки с использованием такролимуса в качестве иммунодепрессанта

Состав ЛПОНП и некоторые показатели плазмы крови
VLDL composition and some blood plasma parameters

Иследуемый показатель	Контроль		ХПН	Перед приемом такролимуса	24 часа после операции		7-е сутки после операции	
	Ж	М			Ж	М	Ж	М
ХС, ммоль/л	0,11±0,08	0,19±0,12 0,039 (ж)	0,38±0,30 0,0023 (ж)	0,19±0,16 0,009 (1)	0,85±2,86 0,006 (жж) 0,049 (2)		0,40±0,28 0,0011 (жж) 0,003 (2)	
ТГ, ммоль/л	0,22±0,14		0,55±0,40 0,0016 (к)	0,25±0,22 0,003(1)	0,50±0,34 0,004 (к) 0,007 (2)		Ж	М 0,59±0,44 0,04 (ж) 0,0059 (к) 0,01 (2)
Белок общий, мг/л	97,91±58,84		258,75±194,19 <0,001 (к)	157,37±135,16	254,41±176,79 <0,001 (к) <0,001 (2)		Ж	М 317,14±117,15 <0,001 (к) 0,044 (2) 0,008 (к)
АпоВ, мг/дл	47,37±14,55	М	49,27±27,56	39,80±28,00 0,018 (мк)	Ж	М	Ж	М 32,29±20,91 0,01 (ж) 0,02 (мк)
ОФЛ, ммоль/мг белка	2,54±4,17		0,88±1,33	1,57±1,85	Ж	М	Ж	М 13,16±61,37
ТГ/ОФЛ	3,07±2,51		4,05±2,94	1,95±1,62 0,017 (1)	32,76±20,32 0,002 (ж) 0,012 (мк)		5,23±2,94 0,032 (к) <0,001 (2)	
Глюкоза, ммоль/л	4,02±0,59		4,64±2,22	6,02±2,72 0,006 (к) 0,028 (1)	51,65±20,86		4,68±1,31	
С-пептид, мкг/л	0,02±0,04		1,57±1,47 <0,001 (к)	0,72±0,68 <0,001 (к)	0,65±0,52		0,87±0,74 <0,001 (к)	

Примечания: статистически значимые отличия по сравнению: к – с контролем, мк – с контролем мужчин, ж – с женщинами той же группы, жж – с женщинами контроля, 1 – с группой до пересадки почки, 2 – с группой после пересадки почки перед назначением такролимуса.



В содержании апоВ сохраняются появившиеся через 24 часа инвертированные по отношению к здоровым людям гендерные отличия. Количество апоВ плазмы крови у мужчин было ниже, чем у женщин ($p=0,01$), и меньше, чем у здоровых мужчин ($p=0,02$). При этом соотношение ТГ/ОФЛ ЛПОНП было выше, чем у здоровых людей ($p<0,001$). Учитывая, что n-концевая часть апоВ₁₀₀ участвует в процессе специфического взаимодействия липопротеинлипазы (ЛПЛ) с ЛПОНП [19], выявленное увеличение содержания ТГ и ХС в ЛПОНП может быть связано с изменением соотношения основных липидов ЛПОНП и конформационными изменениями апоВ, препятствующими специфическому связыванию ЛПЛ с ЛПОНП, а также снижением содержания апоВ в ЛПОНП. Кроме того, известно, что ассоциированный с ЛПВП апоСII может диффундировать к ЛПОНП и активировать ЛПЛ [20], а изменение липидного состава ЛПОНП, вероятно, также может способствовать нарушению взаимодействия апоСII и ЛПОНП и, таким образом, снижать активность ЛПЛ.

Поскольку количество С-пептида на данном сроке исследований остается повышенным по сравнению со здоровыми людьми ($p<0,001$), а концентрация глюкозы остается неизменной, можно предположить, что в основе выявленных проатерогенных сдвигов лежит развивающаяся резистентность к инсулину [8]. Учитывая выявленные изменения апоВ плазмы крови и состава ЛПОНП, возможно, на ранних сроках после пересадки почки целесообразно использование производных фиброевой кислоты у женщин как активаторов липопротеинлипазы. Однако подтверждение целесообразности данного воздействия требует дополнительных исследований.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с терминальной почечной недостаточностью наблюдаются проатерогенные изменения ЛПОНП, характерные для ДЛП IV по Фредрикссону, выражающиеся в росте содержания ХС, ТГ ЛПОНП и нивелировании гендерных отличий по содержанию апоВ, сочетающихся с увеличением количества С-пептида как маркера возможной инсулинорезистентности.
2. Непосредственно после пересадки почки до назначения такролимуса проатерогенные сдвиги не определяются, однако содержание С-пептида остается повышенным, что может быть расценено как сохранение резистентности к инсулину.
3. После начала приема такролимуса через 24 часа и на 7-е сутки после операции вновь развиваются проатерогенные изменения, сопровождающиеся повышенным содержанием С-пептида и появлением гендерных отличий в содержании ТГ ЛПОНП, общего белка и апоВ плазмы крови, вероятно, связанных с повышенной продукцией инсулина.
4. Появление гендерных отличий в составе ЛПОНП требует более пристального внимания к механизмам развития проатерогенных изменений у мужчин и женщин.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Katsakiori P.F., Papapetrou E.P., Goumenos D.S., et al. Tacrolimus and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: An interaction study in CYP3A5 non-expressors, renal transplant recipients. *Indian J Pharmacol.* 2011;43(4):385–388. DOI: 10.4103/0253-7613.83106.
2. Sessa A., Esposito A., Giliberti A., et al. Immunosuppressive agents and metabolic factors of cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2009;41(4):1178–1182. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.02.045.
3. Ichimaru N., Takahara S., Kokado Y., et al. Changes in lipid metabolism and effect of simvastatin in renal transplant recipients induced by cyclosporine or tacrolimus. *Atherosclerosis.* 2001;158(2):417–423. DOI: 10.1016/s0021-9150(01)00438-5.

Изменение состава нативных липопротеинов очень низкой плотности, содержания С-пептида и глюкозы крови у пациентов с терминальной почечной недостаточностью и в ранние сроки после пересадки почки с использованием такролимуса в качестве иммунодепрессанта

4. Thölking G., Schulte C., Jehn U., et al. The Tacrolimus Metabolism Rate and Dyslipidemia after Kidney Transplantation. *J Clin Med.* 2021;10(14):3066. DOI: 10.3390/jcm10143066.
5. Deleuze S., Garrigue V., Delmas S., et al. New onset dyslipidemia after renal transplantation: is there a difference between tacrolimus and cyclosporine? *Transplant Proc.* 2006;38(7):2311–2313. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.06.125.
6. Shchastniy A.T., Osochuk A.S., Osochuk S.S., et al. Influence of kidney failure on the composition of native blood lipoprotein complexes in men and women. *Bulletin of VSMU.* 2022;21(6):71–77. DOI: 10.22263/2312-4156.2022.6.71. (In Russian)
7. Fredrickson D.S., Lees R.S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation.* 1965;31:321–327. DOI: 10.1161/01.cir.31.3.321.
8. Hirano T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2018 Sep 1;25(9):771–782. DOI: 10.5551/jat.RV17023
9. Hirano T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(9):771–782. DOI: 10.5551/jat.RV17023.
10. Bunak V. Allocation of stages of ontogenesis and chronological boundaries of age periods. *Sovetskaja pedagogika.* 1965;11:105–119. (In Russian)
11. Perkins E.G., Lindgren F.T. *Analysis of lipids and lipoproteins.* Champaign IL: American Oil Chemists' Society; 1975.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–275.
13. Kashyap M.L., Hynd B.A., Robinson A. A rapid and simple method for measurement of total protein in very low density lipoproteins by the Lowry assay. *J Lipid Res.* 1980;21(4):491–495.
14. Svanborg A., Svennerholm L., Myrén I., et al. Plasma total lipid, cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids in a healthy Scandinavian population. *Acta Med. Scand.* 1961;169(1):43–49. DOI: 10.1111/j.0954-6820.1961.tb17091.x.
15. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., et al. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software,* 2015;67(1):1–48. DOI: 10.18637/jss.v067.i01.
16. Searle S.R., Speed F.M., Milliken G.A. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. *The American Statistician,* 1980;34(4):216–221. DOI: 10.2307/2684063.
17. Gardner C.D., Tribble D.L., Young D.R., et al. Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use: the Stanford Five City Project. *Prev Med.* 2000;31(4):335–345. DOI: 10.1006/pmed.2000.0715.
18. Sparks J.D., Chamberlain J.M., O'Dell C., et al. Acute suppression of apo B secretion by insulin occurs independently of MTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406(2):252–256. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.028.
19. Choi S.Y., Sivaram P., Walker D.E., et al. Lipoprotein lipase association with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 1995;270(14):8081–8086. DOI: 10.1074/jbc.270.14.8081.
20. Wolska A., Dunbar R.L., Freeman L.A., et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis.* 2017;267:49–60. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.025