

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

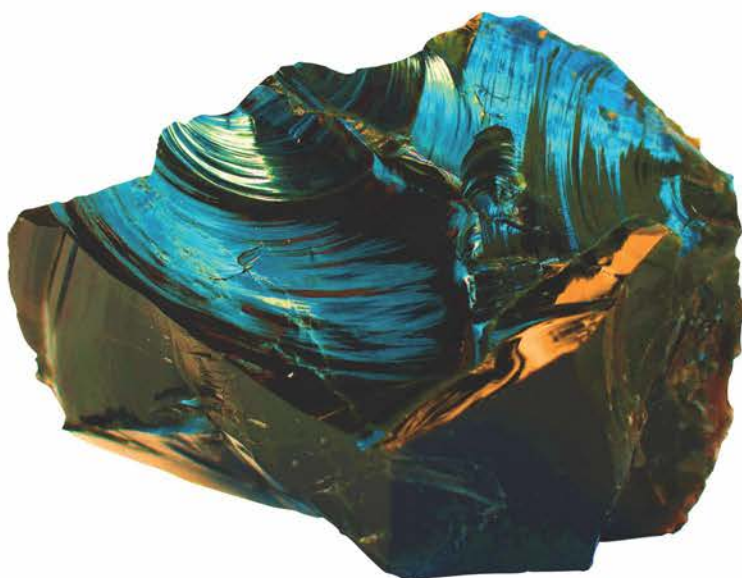
2019, том 8, № 4

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics. Eastern Europe

International Scientific Journal

2019 Volume 8 Number 4



Обсидиан – минерал вулканического происхождения, образующийся в результате быстрого охлаждения магматической породы. Камень был широко распространен среди древних народов Европы и Закавказья и может служить археологам историческим артефактом – по нему изучают миграционные пути и контакты древних поселений. Obsidian присутствует в большом количестве на территории нынешних Ирана, Армении, Грузии и Турции.

ISSN 2226-5392 (Print)
ISSN 2522-137X (Online)

 ПИ
ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

lab.recipe.by

2019, том 8, № 4

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь 02.12.2011
Регистрационное свидетельство № 1496

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

Адрес редакции:
220049, Минск, ул. Кнорина, 17
Тел.: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Директор Евтушенко Л.А.
Заместитель главного редактора Жабинский А.В.
**Руководитель службы рекламы
и маркетинга** Коваль М.А.
Технический редактор Нужин Д.В.

Украина

Журнал зарегистрирован
Государственной регистрационной
службой Украины 02.12.2014
Регистрационное свидетельство № 21184-10984ПР

Учредители:
Национальная медицинская академия
последипломного образования имени П.Л. Шупика
УП «Профессиональные издания»

Представительство в Украине:
ООО «Профессиональные издания. Украина»
04116, Киев, ул. Старокиевская, 10-г, сектор «В»,
офис 201

Контакты:
тел.: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pl_info@ukr.net

Подписка

в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь)
индивидуальный индекс **01389**
ведомственный индекс **013892**

в каталоге ОАО «Арзи» (Российская Федерация)
индекс **01389**

в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан)
индекс **01389**

В Украине подписка оформляется через офис
ООО «Профессиональные издания. Украина»

01389 – единый индекс в электронных каталогах
«Газеты и журналы» на сайтах агентств:
ООО «Информнаука» (Российская Федерация),
АО «МК-Периодика» (Российская Федерация),
ООО «Прессинформ» (Российская Федерация),
ООО «НПО «Информ-система» (Российская Федерация),
ГП «Пресса» (Украина),
ГП «Пошта Молдовей» (Молдова),
АО «Летувос паштас» (Литва),
Kibon&Sagner (Германия),
ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия),
Фирма «INDEX» (Болгария)

Электронная версия журнала доступна
на сайте lab.recipe.by, в Научной электронной
библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View,
в электронной библиотечной системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь
в редакцию в Минске
и представительство издательства в Киеве

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.
Цена свободная

Подписано в печать 12.11.2019.
Тираж в Беларуси 1000 экз.
Тираж в Украине 2000 экз.
Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

Отпечатано

Производственное дочернее унитарное предприятие
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, 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 письменного
разрешения редакции с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2019

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2019

Главный редактор Камышников Владимир Семенович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц. (Минск)
Бадыгина Н.А., к.б.н. (Минск)
Беляев С.А. (Минск)
Бергун О.М., к.б.н., доц. (Минск)
Владимирская Т.Э., к.б.н. (Минск)
Гусина Н.Б., к.м.н., доц. (Минск)
Доценко Э.А., д.м.н., проф. (Минск)
Дубровский А.Ч., к.м.н. (Минск)
Качеровская Е.Р. (Минск)
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф. (Витебск)
Костин Г.М., к.м.н., доц. (Минск)
Костюк С.А., д.м.н., доц. (Минск)
Кочетов А.Г., д.м.н. (Москва)
Кузнецов О.Е., к.м.н., доц. (Гродно)
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц. (Минск)
Лелевич В.В., д.м.н., проф. (Гродно)
Ляликов С.А., д.м.н., проф. (Гродно)
Новикова И.А., д.м.н., проф. (Гомель)
Потапнев М.П., д.м.н., проф. (Минск)
Прохорова В.И., д.м.н., проф. (Минск)
Смирнова Л.А., д.м.н., проф. (Минск)
Смолякова Р.М., д.б.н., доц. (Минск)
Таганович А.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Хуторян Л.М. (Челябинск)

Главный редактор Лунёва Анна Геннадиевна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика, президент Всеукраинской ассоциации клинической химии и лабораторной медицины

Редакционная коллегия:

Бодня Е.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Воронцова Л.Л., д.м.н., проф. (Запорожье)
Вьюницкая Л.В., к.б.н., доц. (Киев)
Гавриленко Т.И., д.б.н., проф. (Киев)
Ермоленко Т.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Завадецкая Е.П., к.м.н., доц. (Киев)
Зяблицев С.В., д.м.н., проф. (Донецк)
Игнатъев А.М., д.м.н., проф. (Одесса)
Клименко С.В., д.м.н., проф. (Киев)
Клищ И.Н., д.б.н., проф. (Тернополь)
Криницкая И.Я., д.м.н., проф. (Тернополь)
Лаповец Л.Е., д.м.н., проф. (Львов)
Леонтьева Ф.С., к.б.н. (Харьков)
Липкан Г.Н., д.м.н., проф. (Киев)
Магомедов А.М., д.б.н., проф. (Киев)
Мацегора Н.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Медведева И.М., к.м.н. (Сумы)
Олейник Е.А., к.м.н., доц. (Киев)
Проценко В.Н., к.м.н., доц. (Харьков)
Ткач Ю.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Хейломский А.Б. (Киев)
Шахнин Д.Б., к.х.н. (Киев)
Якимова Т.П., д.м.н., доц. (Харьков)
Ястремська О.О., к.м.н., доц. (Львов)

Рецензируемое издание

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

Научные статьи, опубликованные в журнале, для украинских соискателей ученых степеней на основании приказа МОНмолодьспорта Украины от 17.10.2012 № 1112 приравниваются к зарубежным публикациям.

Журнал включен в базы данных Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, РИНЦ.

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 точки 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

2019 Volume 8 Number 4

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered
in the Ministry of information
of the Republic of Belarus 02.12.2011
Registration certificate № 1496

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

Address of the editorial office:
220049, Minsk, Knorin str., 17
Phone: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Director Evtushenko L.
Deputy editor-in-chief Zhabinski A.
Head of advertising and marketing Koval M.
Technical editor Nuzhin D.

Ukraine

The journal is registered
at the State registry of Ukraine 02.12.2014
Registration certificate № 21184-10984PR

Founders:
Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education
UE "Professional Editions"

Representative office in Ukraine:
LLC "Professional Editions. Ukraine"
04116, Kyiv, Starokievskaya str., 10-g, sector "B",
office 201

Contacts:
phone: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pl_info@ukr.net

Subscription
in the Republican unitary enterprise "Belposhta"
individual index **01389**
departmental index **013892**

in catalogue JSC "ARZI" (Russian Federation)
index **01389**

in JSC "Kazpochta" catalogue (Kazakhstan)
index **01389**

In Ukraine the subscription is made out through office
LLC "Professional Edition. Ukraine"

Index **01389** in the electronic catalogs "Newspapers
and Magazines" on web-sites of agencies:
LLC "Informnauka" (Russian Federation),
JSC "MK-Periodika" (Russian Federation),
LLC "Pressinform" (Russian Federation),
LLC "SPA "Inform-system" (Russian Federation),
SE "Press" (Ukraine),
SE "Poshta Moldovey" (Moldova),
JSC "Letuvos pashtas" (Lithuania),
Kubon&Sagner (Germany),
LLC "Subscription Agency PKS" (Latvia),
INDEX Firm agency (Bulgaria)

The electronic version of the journal
is available on lab.recipe.by,
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 in Minsk
and publishing house representation in Kyiv

The frequency of journal is 1 time in 3 months.
The price is not fixed

Sent for the press 12.11.2019.
Circulation in Belarus is 1000 copies
Circulation in Ukraine is 2000 copies
Order №

Format 70x100 1/16 Litho

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics. Eastern Europe"

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

© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2019

© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2019

Belarus

Ukraine

Editor-in-Chief Vladimir S. Kamyshnikov,
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Clinical Laboratory Diagnostics Department
of Belarusian Medical Academy of Postgraduate
Education (Minsk)

Editorial Board:

Alekhovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Badygina N., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)
Beliaev S. (Minsk)
Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci. (Minsk)
Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Hutoryan L. (Chelyabinsk)
Kacherovskaya E. (Minsk)
Kochetov A., Dr. of Med. Sci. (Moscow, Russia)
Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Vitebsk)
Kostin G., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kostyuk S., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuznetsov O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Grodno)
Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Gomel)
Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smirnova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Minsk)
Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Vladimirskaya T., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)

Editor-in-Chief Ganna G. Lunova,
Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Clinical
Laboratory Diagnostics Department of Shupyk
National Medical Academy of Postgraduate Education,
President of Ukrainian Association of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine (Kyiv)

Editorial Board:

Bodnya E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Ermolenko T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Gavrilenko T., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Ignatyev A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Kheilomskyi A. (Kyiv)
Klimenko S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Klishch M., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Ternopil)
Krinitckaya I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Ternopil)
Lapovets L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Lviv)
Leont'eva F., Cand. of Biol. Sci. (Kharkiv)
Lipkan G., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Magomedov A., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Matsegora N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Medvedeva I., Cand. of Med. Sci. (Sumy)
Oliyynyk E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Protsenko V., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kharkiv)
Tkach Yu., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Shakhnin D., Cand. of Chemic. Sci. (Kyiv)
Vorontsova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Zaporizhia)
Vyyunitskaya L., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Yakimova T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Yastrem'ska O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Lviv)
Zavadetskaya E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Zyblit'sev S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Donetsk)

Peer-Reviewed Edition

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 № 06-18/2).

Scientific articles published in the journal for Ukrainian applicants of academic degrees on the basis of the order of Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from 17.10.2012 № 1112 are equated to foreign publications.

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

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.

Уважаемые читатели!

Настоящий номер журнала открывается статьей, вновь обращающей внимание специалистов лабораторной диагностики на ранее затронутую коллегами из Украины актуальную проблему – совершенствования контроля качества на основе внедрения индикаторов качества в деятельность клиничко-диагностических лабораторий медицинских организаций.

Одна из представленных статей содержит обстоятельную информацию, представляющую новый взгляд на возможную роль гипохолестеролемии и нарушения липопротеинового распределения холестерина в формировании определенных особенностей поведения, выражающихся в склонности к совершению суицидальных попыток.

Не менее интересны данные, приведенные в других публикациях. Так, сотрудниками Республиканского центра психического здоровья и Института физиологии Национальной академии наук Беларуси с использованием специальных лабораторных тестов – иммуномаркеров поражения нервной ткани – установлены новые патобиохимические механизмы развития аутизма и нарушений психоречевого развития.

Примечательно, что этот номер журнала продолжает традицию публикации статей, посвященных актуальным проблемам лабораторной медицины, в том числе спортивной медицины, а именно генетическим факторам, создающим предпосылки к достижению спортивных успехов.

Ряд статей содержит материал, ориентированный на совершенствование клинической лабораторной диагностики отдельных инфекционных и неинфекционных заболеваний, в том числе в области акушерства и гинекологии, кардиологии, нефрологии, неврологии. Особое внимание уделено установлению критериев диагностики послеродовой инволюции матки, прогнозированию неблагоприятного исхода прогрессирующего развития проявлений сердечно-сосудистой патологии при остром коронарном синдроме.

Наконец, привлекает внимание статья, отражающая участие коллектива ученых – специалистов из Польши (независимого исследователя из Варшавы), Германии (специализированная клиника), Швейцарии (Фрибургский университет), Беларуси (Гомель: медицинский университет; Минск: Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам) в разгадке тайны мозырской «чупакабры».

В преддверии наступающего 2020 года хотелось бы пожелать всем читателям журнала крепкого здоровья, счастья, дальнейших больших творческих успехов в профессиональной и научно-практической деятельности.

Главный редактор в Беларуси
Камышников Владимир Семенович




Организация деятельности

клинико-лабораторной службы

Модели индикаторов качества и аспекты их внедрения в работу клинико-диагностических лабораторий. Часть II
Максимюк Г.В., Ястремская О.О., Лаповец Л.Е. 452

Оригинальные исследования

Особенности содержания холестерина и его липопротеиновых фракций в периферической крови лиц, совершивших суицидальные попытки
Давидовский С.В., Ибрагимова Ж.А., Картун Л.В., Ходосовская Е.В., Леонов Н.Н., Таболина А.А., Камышников В.С. 461

Особенности изменения показателей состояния воспалительного и аутоиммунного процессов у детей с аутизмом и нарушениями психоречевого развития органического генеза
Митюкова Т.А., Докукина Т.В., Полулях О.Е., Захаревич О.Ю., Мартыненко А.И. 470

Лабораторные исследования в спортивной медицине

Анализ частот генетических полиморфизмов спортсменов игровых видов спорта Республики Беларусь
Сосна Л.С. 480

Микробиология и вирусология

Грибковые (криптококковые) поражения центральной нервной системы у ВИЧ-позитивных пациентов: методы ранней диагностики и определения чувствительности к противогрибковым препаратам
Зайцева В.Н., Розачева Т.А., Анисько Л.А., Соловей Н.В. 490

Усовершенствование бактериологического метода диагностики гонореи: опыт Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера, Украина
Бойко И.Б., Криницкая И.Я. 498

Лабораторные исследования в клинической практике

Особенности изменений в общем анализе крови у привитых и непривитых детей с коклюшем: лабораторные критерии диагностики инфекционного заболевания
Гаврилова О.А., Астапов А.А. 507

Биохимические критерии послеродовой субинволюции матки
Верес И.А., Пересада О.А., Юрага Т.М. 515

Сравнительная оценка выраженности процессов кардионекроза, протеолиза и фосфолиполиза при острых формах ишемической болезни сердца: значимость определения ассоциированного с беременностью белка плазмы-А и общей активности фосфолипазы как тестов прогнозирования неблагоприятных исходов формирования острого коронарного синдрома
Яковлев-Малых Н.Н., Камышников В.С., Борисенко Т.Д. 526

Новые технологии в лабораторной диагностике

Новые возможности дифференциальной диагностики острых респираторных вирусных заболеваний на основе использования разработанных в Республике Беларусь технологий молекулярно-биологического исследования
Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Лапо Т.П. 535

Высокотехнологичные лабораторные исследования

Исследование компонентов системы комплемента в дифференциальной диагностике врожденного (наследственного) ангионевротического отека
Гурьянова И.Е., Коростелева Л.Б., Полякова Е.А., Пугачёва В.В., Ермилова Т.И., Скопонец Е.Я., Любушкин А.В., Жаранкова Ю.С., Алешкевич С.Н., Белевцев М.В. 553

Оценка аллогенного иммунного ответа у реципиентов при трансплантации почки
Зыблева С.В., Зыблев С.Л. 565

Мозырская «чупакабра» – что говорит наука?
Алексинская О.А., Алексинский В.С., Зиновкин Д.А., Шпак А.В., Хейдорова Е.Э., Дебелый М.А. 574

Практикующему врачу

Внелaborаторный анализ: современные технологии сухой химии в практике лабораторного исследования вне стационарной клинико-диагностической лаборатории
Камышников В.С., Кузьменко А.Т., Батуревич Л.В. 587

Пост-релиз

Формула PUBLIC HEALTH приобрела еще большую актуальность и подтвердила статус единого собрания медицинского сообщества Украины 596

Organization of Clinical Laboratory Service Work

Models of Quality Indicators and Aspects of their Introduction to the Work of Clinical-Diagnostic Laboratories. Part II
Maksymyuk H., Yastremska O., Lapovets L.452

Original Researches

Features of the Content of Cholesterol and its Lipoprotein Fractions in the Peripheral Blood of Persons who Had Suicidal Attempt
Davidouski S., Ibragimova J., Kartun L., Chodosovskaya L., Leonov N., Tabolina A., Kamyshnikov V.461

Features of Changing Indicators of the State of Inflammatory and Autoimmune Processes in Children with Autism and Impaired Psycho-Speech Development of Organic Origin
Mityukova T., Dokukina T., Polulyakh O., Zakharevich O., Martynenko A.470

Laboratory Researches in Sports Medicine

Analysis of the Frequency of Genetic Polymorphisms of Sports Athletes in the Republic of Belarus
Sosna L.480

Microbiology and Virology

Fungal (Cryptococcal) Lesions of the Central Nervous System in HIV-Positive Patients: Methods of Early Diagnostics and Determination of Sensitivity to Antifungal Drugs
Zaitseva V., Rogacheva T., Anisko L., Solovej N.490

Improvement of Bacteriological Method of Diagnostics of Gonorrhoea: Experience of Ternopil Regional Clinical Dermatovenereological Dispensary, Ukraine
Boiko I., Krynytska I.498

Laboratory Researches in Clinical Practice

Features of Changes in the General Analysis of Blood in Vaccinated and Unvaccinated Children with Whooping Cough: Laboratory Criteria for Diagnostics of Infectious Disease
Gavrilova O., Astapov A.507

Biochemical Criteria of Postpartum Uterine Subinvolution
Veres I., Peresada O., Yuraga T.515

Comparative Assessment of the Severity of Processes of Cardionecrosis, Proteolysis and Phospholipolysis in Acute Forms of Coronary Heart Disease: the Importance of Determination of the Pregnancy-Associated Plasma Protein-A and the Total Activity of Phospholipase as Tests for Prediction of Adverse Outcomes of Formation of Acute Coronary Syndrome
Yakovlev-Malykh N., Kamyshnikov V., Borisenko T.526

New Technologies in Laboratory Diagnostics

New Opportunities for Differential Diagnostics of Acute Respiratory Viral Diseases on the Base of the Use of Molecular Biological Research Technologies Developed in the Republic of Belarus
Sivets N., Shmeleva N., Lapo T.535

High-Tech Laboratory Testing

Study of the Components of the Complement System in Differential Diagnostics of Congenital (Hereditary) Angioedema
Guryanova I., Korosteleva L., Polyakova E., Pugacheva V., Ermilova T., Skapavets K., Liubushkin A., Zharankova Yu., Aleshkevich S., Belevtsev M.553

Assessment of Allogeic Immune Response in Kidney Transplant Recipients
Zybleva S., Zyblev S.565

Mozyr "Chupacabra" – what does Science Say?
Aliaksinskaya V., Aliaksinski V., Zinovkin D., Shpak A., Kheidorova E., Debely M.574

Максимюк Г.В., Ястремская О.О., Лаповец Л.Е.
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого,
Львов, Украина

Maxsmyuk H., Yastremska O., Lapovets L.
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Модели индикаторов качества и аспекты их внедрения в работу клиничко-диагностических лабораторий. Часть II

Models of Quality Indicators and Aspects of their Introduction to the Work of Clinical-Diagnostic Laboratories. Part II

Резюме

В данной статье рассматриваются вопросы важности применения индикаторов качества (ИК) в лабораторной практике, их стандартизации; предоставлено описание основных характеристик ИК в соответствии с рекомендациями рабочей группы WG-LEPS IFCC и возможностей применения модели ИК (MQI) для улучшения внешней оценки качества этапов лабораторного исследования (EQAP); значение программного обеспечения для мониторинга и анализа ИК, опыт других лабораторий в этих вопросах и возможности позитивных изменений основных процессов.

Ключевые слова: индикаторы качества, стандартизация, контроль качества, лабораторные ошибки, модель индикаторов качества, преаналитический, аналитический и постаналитический этапы исследования.

Abstract

The importance of use of the quality indicators (QI) in laboratory practice and their standardization are discussed in the article. There is presented the description of the main characteristics of the QI in accordance with the recommendations of the WG-LEPS IFCC working group and the possibilities of using the QI model (MQI) to improve the external quality assessment of the stages of laboratory research (EQAP). There is also discussed the importance of software for monitoring and analysis of QI, experience of other laboratories in these issues, and the possibility of positive changes in the main processes.

Keywords: quality indicators, standardization, quality control, laboratory errors, model of quality indicators, preanalytical, analytical and postanalytical stages of research.

Функционирование системы здравоохранения невозможно без лабораторной медицины как одного из важнейших ее компонентов. Медицинские лаборатории предоставляют лабораторные услуги (результаты клиничко-лабораторного исследования) для клинициста и пациента,

необходимые для профилактики, своевременной диагностики, эффективного лечения и прогноза течения болезни. От их достоверности и своевременности часто зависит здоровье и жизнь пациента. В настоящее время возможности медицинских (клинико-диагностических) лабораторий качественно и количественно изменились под воздействием научно-технического прогресса, который существенно расширил спектр исследуемых аналитов и предоставил беспрецедентное разнообразие аналитических технологий. В ведущих странах мира определены строгие требования к технологиям достижения надежных результатов лабораторных исследований, и соответствующее их высокое качество достигается созданием в медицинских лабораториях системы его гарантирования с использованием технологий стандартизации [10, 22]. Сегодня в области лабораторной медицины действует более 300 международных стандартов, регламентирующих работу клинико-диагностических лабораторий, охватывающих практически все ее проблемы. Опыт работы многих лабораторий подтверждает тот факт, что стандартизация определяет их успешное функционирование [7, 11, 16].

Для контроля всех этапов клинико-лабораторных исследований и оценки критических аспектов процесса тестирования проб биологического материала необходимо внедрять в работу медицинских лабораторий специально разработанные индикаторы качества (ИК).

Индикаторы качества являются инструментами управления процессами преаналитической, аналитической и постаналитической фаз клинико-лабораторного исследования. По определению, данному М. Плебани и его коллегами, индикатор качества – это базовый инструмент, позволяющий пользователям количественно оценить качество выбранных элементов путем сравнения с определенными критериями. По своей сути индикатор качества – это критерий результативности, позволяющий определить факт достижения целевого уровня [15]. Работа над выявлением и установкой индикаторов качества в сфере лабораторной медицины началась относительно недавно и поэтому требует тщательного изучения [12–16].

Стандартизация индикаторов качества

Известно, что целью стандартизации является достижение такого уровня качества лабораторных исследований, который наилучшим образом удовлетворит как клиницистов, так и пациентов. Стандарты всегда содержат научно обоснованные индикаторы правильного выполнения определенных технологических операций, которые разработаны на основании оценки значительного количества процессов в клинико-диагностических лабораториях. Решение задачи стандартизации работы медицинской лаборатории, а именно ИК, существенно уменьшит количество ошибок и улучшит качество предоставления медицинской помощи населению [11, 22, 23].

Остановимся подробнее на информации, которую стоит включить в описание ИК. Во-первых, необходимо отметить, с какой именно целью (технологической/управленческой) в лаборатории будет использован тот или иной ИК, описать его спецификацию (что именно измеряем, каким образом собираем данные, приемлемость лимитов для результатов, область лаборатории, где они могут использоваться,

и индивидуальная ответственность каждого работника). Гармонизация любого процесса должна базироваться на четко озвученных критериях. Результатом работы IFCC WG-LEPS стало подробное описание основных характеристик ИК:

- ИК должны быть пациент-центрированными, так как основной задачей их приложения является безопасность пациента;
- должны согласовываться с определением «лабораторная ошибка», которое базируется на ISO/TS 22367:2008, и оценивать все стадии процесса тестирования пробы (total testing process (TTP));
- соответствовать требованиям ISO 15189:2012.

Четкое определение любого ИК поможет персоналу лаборатории понять: что именно они измеряют; каких стандартизированных процедур необходимо придерживаться; тип ТТР; способ, с помощью которого будет проводиться то или иное измерение, и каким образом будет передаваться собранная информация. Также важно указывать лицо, которое собирало, анализировало и проводило корректирующие действия; кроме того, необходимо уяснить, как часто будет собираться информация и способы ее анализа.

МQI была обсуждена и внедрена в 2013 году на «Consensus Conference held» в городе Padova. Модель стали тестировать с 2014 года в специально разработанной программе внешней оценки качества, участие в которой является бесплатным, а результаты оценки – конфиденциальными [13]. MQI в целом содержит 53 индикатора качества в соответствии с основными процессами (рис. 1) [21].

Для преаналитической фазы предлагается применить 28 индикаторов, аналитической – 6, а для постаналитической – 11. Кроме того, 5 индикаторов рекомендуется применить для поддерживающих процессов (по 2 для оценки компетентности персонала и удовлетворенности клиентов, 1 – для оценки эффективности ЛИС) и 3 – для оценки внешних измерений (повторное взятие проб крови, исправление результатов и безопасность сотрудников). Для каждого индикатора был

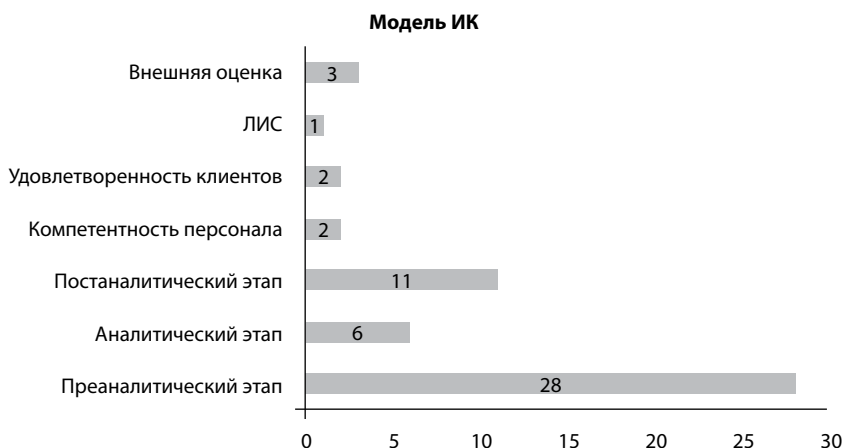


Рис. 1. Количество индикаторов качества относительно основных процессов в клинико-диагностических лабораториях (www.ifcc-mqi.com)

разработан номер приоритетности от 1 до 4. ИК с приоритетностью 1 – наиболее важные, и их необходимо внедрять в работу лаборатории первыми. Важным для сравнения результатов, полученных от разных лабораторий, является также процесс стандартизации сбора данных. Для облегчения понимания этого процесса WG-LEPS предлагает модель ИК, согласно которой их стоит дополнительно разделить еще на несколько групп (рис. 2).

К первой группе отнесли образцы, в которых были допущены ошибки идентификации. В частности, это были случаи, когда в лаборатории: неправильно идентифицировали запрос; на исследование поступил ошибочный образец; проба, которую направили на тестирование, содержала меньше двух идентификаторов, или на ней вообще отсутствовала маркировка.

Ко второй группе принадлежат ИК относительно ошибок, допускаемых при переписывании. Например, случаи, когда теряется, добавляется или неправильно называется тест. В каждой из этих групп необходимо отслеживать пробы, которые поступают из собственного учреждения и из пунктов забора.

К третьей группе отнесли образцы неприемлемого/неуместного типа, для забора которых использовали неподходящий контейнер, или они содержали недостаточный объем биологического материала; а также образцы, в которых не придерживались соответствующего соотношения между количеством антикоагулянта и биологического материала, обнаружили сгусток, гемолиз или которые были загрязнены посторонними материалами.

Четвертую группу составили образцы, при доставке которых не соблюдались условия их хранения и транспортирования, а именно: образцы, которые в лабораторию так и не поступили; образцы, которые неправильно хранились перед проведением анализа; доставленные с превышением допустимого времени транспортировки и с нарушением требований ее температурного режима, а также те, которые повреждались в процессе доставки.

Пятая группа содержала семь измерений, которые оценивали соответствие относительно времени отправки результатов: количество сообщений, разосланных лабораторией позже взаимосогласованного времени доставки, время обработки теста в минутах, в частности для калия, величины международного нормализационного отношения (МНО), количество лейкоцитов, тропонина I или тропонина T [3]; количество критических величин, которые сообщались после взаимосогласованного времени (период от валидации теста до коммуникации с клиницистом), отдельно для пациентов собственного медицинского учреждения (стационара), и проб, которые поступили из пунктов забора.

К шестой группе отнесли одно измерение, которое касалось количества некорректных отчетов, предоставленных лабораторией.

Данные, присылаемые IFCC WG-LEPS, обрабатываются каждый месяц относительно параметров: общего количества результатов, среднего значения, моды и медианы. Участникам программы внешней оценки организаторы сообщают значения относительно конкретной лаборатории, группы лабораторий из той же страны и относительно всех лабораторий-участников проекта.

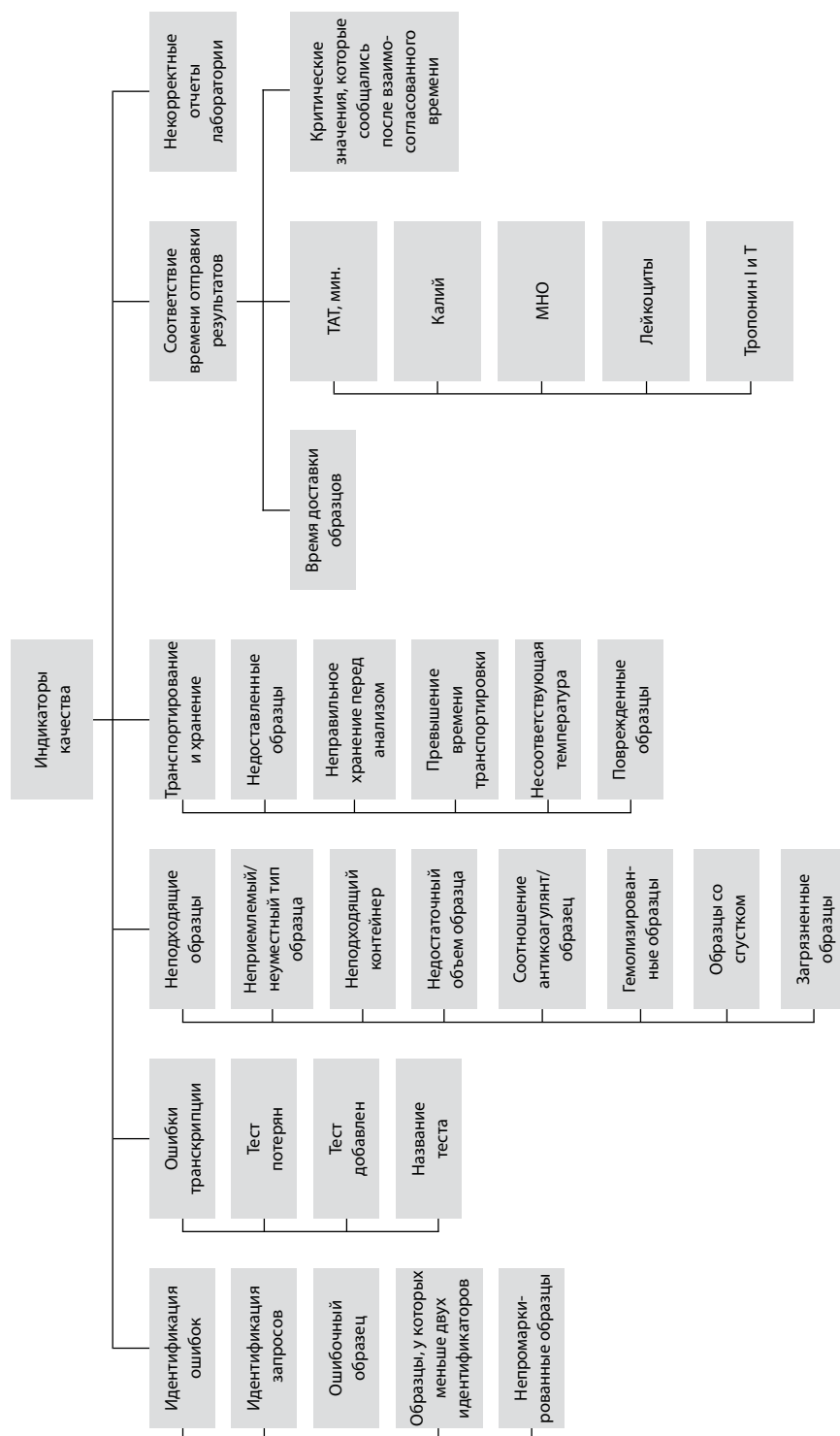


Рис. 2. Индикаторы качества согласно разработке рабочей группы WG-LEPS IFCC (2017)

Программное обеспечение для мониторинга и анализа индикаторов качества

Во время пре-преаналитической фазы клиницисты, в соответствии с клинической задачей, формируют и оформляют направление на исследование; информируют пациентов о правильной подготовке к сдаче анализов; флеботомисты/медсестры осуществляют забор биологического материала, идентифицируют пациентов и маркируют пробы; курьеры обеспечивают доставку образца в лабораторию за соответствующий временной промежуток и в определенных температурных условиях. Эти процессы, как правило, не контролируются лабораторией, а количество ошибок, допускаемых именно на этом этапе, значительно выше, чем на преаналитическом, который осуществляется непосредственно в лаборатории [6, 20]. Во время «настоящей» преаналитической фазы в клинико-диагностическом учреждении доставленные образцы регистрируют, центрифугируют, аликвотируют и сортируют [10].

Мониторинг и анализ результатов внедрения ИК можно проводить с помощью собственноручно разработанной таблицы в Excel [9] или специально разработанного программного обеспечения. Несколько лет назад было создано программное обеспечение, задачей которого является помощь в стандартизации процессов и фиксации ошибок [8, 19]. Эта программа дает возможность вносить информацию о дате поступления образца в лабораторию, идентификационный номер пробы, имя пациента, тип образца, а также обнаруженное несоответствие, которое отвечает списку ИК, разработанному IFCC. Кроме того, можно идентифицировать лицо, которое определило несоответствие и другую текущую информацию, которая помогает фиксировать допущенные ошибки.

Неточности, возникающие на постаналитическом этапе, как правило, обусловлены плохой коммуникацией между работниками лабораторий и клиницистами, а именно, неполным информированием относительно сроков предоставления результатов исследований, несвоевременным извещением о критических величинах и отсутствием интерпретации полученных данных. Очень важно, чтобы результаты, которые предоставляет лаборатория, были своевременными, правдивыми, актуальными и недорогостоящими. К сожалению, о качестве работы лабораторий часто судят по тому, как быстро лаборанты выдают результаты исследований, поэтому, чтобы ускорить процесс лабораторной диагностики, многие из них жертвуют аналитическим качеством.

Для максимального сокращения времени информирования клиницистов и пациентов о результатах исследований аналитов в лаборатории можно и нужно внедрять автоматизированную систему сообщения результатов. Врачи-лаборанты и клиницисты смогли бы своевременно получать информацию о наличии критических показателей у пациента (alarm-system). Это способствовало бы эффективной заботе о пациентах и удовлетворило клиницистов. Для улучшения организации труда сотрудников в лаборатории можно внедрять маркировку проб в соответствии с первоочередностью сообщения результатов (ургентные/плановые), а также указывать локацию, откуда поступил образец (стационар, амбулатория или ургентные исследования), время, необходимое для выполнения теста и сообщения результатов врачу. Другая проблема, с которой сталкиваются как клиницисты, так и лаборанты, – это ошибки

или неточности в отчетах, которые предоставляет лаборатория. В частности, в них могут содержаться информация без интерпретации данных или некорректные референтные интервалы определенных аналитов. Например, могут отсутствовать или не соответствовать действительности единицы измерения, что может нанести вред здоровью пациента в результате неправильной интерпретации результатов исследований клиницистом и недооценки им жизненно важной информации. Поэтому работники лаборатории обязательно должны предоставлять клиницистам информацию относительно интерпретации результатов исследований. Это даст возможность врачам комплексно подойти к оценке состояния пациента. Особенно важное значение приобретает этот аспект в случаях, когда данные анализируют в динамике заболевания, а заказанный тест нечасто выполняется в лаборатории, или когда на результаты теста могли повлиять пре- и постаналитические факторы.

Эффективность процесса будет зависеть от ряда факторов: лидерских качеств менеджеров, совместных усилий всех сотрудников, совершенства разработанных процедур внедрения процессов, индивидуальной ответственности работников и постоянного участия менеджмента и сотрудников в образовательных программах. Кроме того, необходимо помнить о том, что другим источником информации относительно улучшения процессов в лаборатории, являются отзывы пациентов, клиницистов и сотрудников лаборатории, а также система внешних аудитов и менеджмента нежелательных событий (ошибки, жалобы, несоответствия).

На что же стоит обращать внимание при внедрении процесса мониторинга качества на всех этапах исследования биологического материала? Рабочая группа, изучающая лабораторные ошибки и безопасность пациентов (WG-LEPS) (работает с 2008 года), разработала перечень индикаторов качества, которые рекомендуется внедрять в работу лабораторий во всем мире [12, 17]. Вся информация относительно перечня и приоритетности ИК доступна для лабораторий с 2017 года на сайте http://www.ifccmqi.com/MqiWeb/Page_QualityIndicators.jsf [4].

Согласно ISO/TS 22367:2008 [5], лабораторная ошибка может возникнуть на всех этапах процесса, начиная от пре-преаналитики до постаналитики, организация которых должна отвечать требованиям ДСТУ EN ISO 15189:2015 [2]. В настоящее время много лабораторий мирового сообщества имеют внедренные ИК, в частности лаборатории таких стран и регионов, как Австралия, Новая Зеландия, Бразилия, Каталония, Англия, Китай и Хорватия [1, 7, 18].

Однако индикаторы качества, внедренные разными учреждениями, базируются на разных критериях и методах, а результаты, которые они сообщают, не являются сопоставимыми. Поэтому одной из задач рабочей группы является помощь лабораториям в стандартизации и гармонизации процесса оценивания качества общего тестирующего процесса, которые должны ставить пациента на центральное место, обеспечивая его безопасность. Это предлагается организовать путем внедрения в работу лабораторий измерительных показателей ИК, с помощью которых лаборатория сможет оценить процессы и провести корректирующие действия. Важно, чтобы ИК, которые используются лабораториями всего мира, были сопоставимы. Поэтому IFCC WG-LEPS предложила дать

определение каждому из них, указав четкие критерии относительно того, что именно должно измеряться, какие стандарты работы ожидаются от персонала, фазы привлечения общего тестирующего процесса (ТТР), как именно будут проводиться измерения и что это даст работникам. Необходимо также четко прописать условия передачи этой информации в центр оценивания.

■ ВЫВОДЫ

1. Стандартизация процессов контроля качества на всех этапах клинико-лабораторного исследования позволит улучшить организацию работы медицинской лаборатории, а также качество предоставления медицинской помощи населению.
2. Модель индикаторов качества, которую разработала WG-LEPS, и программа внешней оценки качества процесса тестирования на основе внедренных индикаторов качества позволят учреждениям проследить динамику позитивных или негативных изменений в собственной лаборатории.
3. Участие лаборатории в проекте IFCC WG-LEPS даст возможность оценить свою позицию относительно национального и мирового рейтинга, а также внедрить качественные изменения в лабораторную медицину страны.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Barth J.H. (2012) Clinical quality indicators in laboratory medicine. *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 49, pp. 9–16.
2. DP UkrNDNTs (2015) *DSTU EN ISO 15189:2015 Medical laboratories – Requirements for quality and competence*. Kyiv, DP UkrNDNTs.
3. Hee-Jung Chung, Woochang Lee, Sail Chun. (2009) Analysis of turnaround time by subdividing three phases for outpatient chemistry specimens. *Ann. Clin. Lab.Sci. Spring*, vol. 39, no 2, pp. 144–149.
4. http://217.148.121.44/MqiWeb/Page_QualityIndicators.jsf
5. International Organization for Standardization (2008) *ISO/PDTS 22367 Medical Laboratories: reducing error through risk management and continual improvement*. Geneva: ISO.
6. Kemp G.M., Bird C.E., Barth J.H. (2012) Short-term interventions on wards fail to reduce preanalytical errors: results of two prospective controlled trials. *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 49, pp. 166–169.
7. Khouty M., Burnett L., Mackay M. (1996) Error rate in Australian chemical pathology laboratories. *Med. J. Aust.*, vol. 165, pp. 128–130.
8. Lippi G., Bonelli P., Rossi R. (2010) Development of a preanalytical errors recording software. *Biochem. Med.*, vol. 20, pp. 90–95.
9. Makhmutova L. (2016) Experience in implementation quality indicators in the pre-analytical phase of laboratory practice. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, vol. 5, no 1, pp. 47–52.
10. Maksymyuk H.V. (2017) Process standardization of the pre-analytical stage in clinical diagnostic laboratories. *Bulletin of problems in biology and medicine*, no 1(135), pp. 46–51.

11. Maksymyuk H., Yastremska O., Lapovets L. (2019) Models of quality indicators and aspects of their introduction to the work of clinical-diagnostic laboratories. Part I. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, vol. 8, no 3, pp. 318–325.
12. Plebani M., Astion M.L., Barth J.H. (2014) Harmonization of quality indicators in laboratory medicine. A preliminary consensus. *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 52, pp. 951–958.
13. Plebani M., Sciacovelli L., Aita A. (2017) Quality indicators for the total testing process *Clin. Lab. Med.*, vol. 37, pp. 187–205.
14. Plebani M., Sciacovelli L., Aita A. (2015) Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase. *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 53, pp. 943–948.
15. Plebani M., Sciacovelli L., Marinova M., Marcuccitti J., Chiozza M.L. (2013) Quality indicators in laboratory medicine: A fundamental tool for quality and patient safety. *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 46, pp. 1170–1174.
16. Sciacovelli L., Aita A., Padoan A. (2016) Performance criteria and quality indicators for the post-analytical phase. *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 54, pp. 1169–1176.
17. Sciacovelli L., Plebani M. (2009) The IFCC Working Group on laboratory errors and patient safety. *Clin. Chim. Acta*, vol. 404 (1), pp. 79–85.
18. Shcolnik W., de Oliveira C.A., de Sao Jose A.S. (2012) Brazilian laboratory indicators program. *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 50, pp. 1923–1924.
19. Shilo V., Suvorova I., Novikava I., Kovaleva O., Yakhnovets E. (2016) Experience of introduction pre-analytical quality indicators in the practice of laboratory investigation. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, vol. 5, no 1, pp. 34–42.
20. Wallin O., Soderberg J., Van Guelpen B. (2008) Preanalytical venous blood sampling practices demand improvement: a survey of test-request management, test tube labelling and information search procedures. *Clin. Chim. Acta*, vol. 391, pp. 91–97
21. www.ifcc-mqi.com
22. Yastremska O.O. (2015) Problems of standardization implementation in clinical diagnostic laboratories of Ukraine. *LABOR NTSh. Volume XLIII. Medical science. Medicinal REVIEW. The new series*, vol. XXVII, pp. 159–170.
23. Zaremba E.F., Yastremska O.O., Zaremba-Fedchyshyn E.V., Zaremba O.V. (2018) The importance of laboratory medicine in the family doctor practice at the stage of the primary health care reform. *Family medicine*, no 1, pp. 47–50.

Поступила/Received: 28.10.2019

Контакты/Contacts: maksymyuk_hanna@meduniv.lviv.ua, oksana_yastremska@ukr.net, lapovets@ukr.net

УДК 616.89-008.441.44:616.15-074:547.922

Давидовский С.В.¹, Ибрагимова Ж.А.², Картун Л.В.², Ходосовская Е.В.², Леонов Н.Н.³, Таболина А.А.¹, Камышников В.С.¹

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

³ Институт социологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Davidouski S.¹, Ibragimova J.², Kartun L.², Chodosovskaya L.², Leonov N.³, Tabolina A.¹, Kamyshnikov V.¹

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³ Institute of Sociology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Особенности содержания холестерина и его липопротеиновых фракций в периферической крови лиц, совершивших суицидальные попытки

Features of the Content of Cholesterol and its Lipoprotein Fractions in the Peripheral Blood of Persons who Had Suicidal Attempt

Резюме

Введение. В статье представлена информация о содержании общего холестерина и его липопротеиновых фракций в периферической крови лиц, совершивших суицидальные попытки. В группу сравнения вошли лица, перенесшие расстройство адаптации, но не совершавшие при этом суицидальных попыток.

Цель. Установление зависимостей между показателями содержания общего холестерина и его липопротеиновых фракций у лиц, совершивших суицидальные попытки с разной степенью выраженности к их осуществлению.

Материалы и методы. На основании анализа 15 996 случаев парасуицидов и 2355 случаев суицидов сформированы три исследовательские группы: лица, использовавшие высоколетальные способы самоповреждения (1), лица, совершившие самоповреждения другими различными способами (2), и лица с диагнозом «адаптационное расстройство (F43.2)», суицидальных попыток не совершавшие (3).

В процессе проведения исследования определялось содержание общего холестерина (ОХС) и его липопротеиновых фракций в периферической крови, уровень перенесенного стресса, уровень депрессии и мотивация к совершению суицида. Полученные данные обработаны методами математической статистики с помощью пакета SPSS Statistics 22.

Результаты и обсуждение. Наиболее низкие показатели ОХС и холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) отмечались у лиц, совершивших парасуицид с высокой вероятностью летального исхода. Выявлена высокая степень взаимосвязи между уровнями ОХС и ХС-ЛПНП у лиц, склонных к самоповреждающему поведению.

Выводы. Для лиц, склонных к суицидальному поведению, характерны более низкие показатели ОХС и ХС-ЛПНП по сравнению с аналогичными показателями у лиц, суицидальных попыток не совершивших. Наиболее низкие в сравнении с соответствующими референтными величинами населения Республики Беларусь показатели содержания ОХС в сыворотке крови мужчин отмечены у лиц, использовавших высоклетальные способы самоповреждения.

Ключевые слова: холестерин, липопротеины низкой плотности, липопротеины высокой плотности, триглицериды, парасуицид.

Abstract

Introduction. The article provides information on the content of total cholesterol and its lipoprotein fractions in the peripheral blood of individuals, who have committed suicidal attempts. The comparison group included persons, who had an adaptation disorder, but did not commit suicide attempts.

Purpose. To reveal dependencies between the levels of total cholesterol and its lipoprotein fractions in individuals, who have made suicidal attempts with different degrees of severity to their implementation.

Materials and methods. On the base of analysis of 15 996 cases of parasuicides and 2355 cases of suicides, three research groups were formed: people, who used highly lethal methods of self-harm (1), people, who committed self-harm in other different ways (2), and people with the diagnosis of "adaptive disorder (F43.2)", suicidal unsuccessful attempts (3).

During the study, the content of total cholesterol (hereinafter referred to as OXS) and its lipoprotein fractions in the peripheral blood, the level of experienced stress, the level of depression, and the motivation for committing suicide were determined. The obtained data were processed with the methods of mathematical statistics using the SPSS Statistics 22 package.

Results and discussion. The lowest levels of total cholesterol and cholesterol of low-density lipoproteins (hereinafter referred to as LDL-C) were observed in persons, who committed a parasuicide with a high probability of death. A high degree of correlation between the levels of total cholesterol and cholesterol-LDL was found in individuals prone to self-harming behavior.

Conclusions. Persons prone to suicidal behavior are characterized by lower levels of total cholesterol and cholesterol-LDL if compared with similar rates of individuals, who have not made suicidal attempts. The lowest (in comparison with the corresponding reference values of the population of the Republic of Belarus) indicators of the content of total cholesterol in the blood serum of men were observed in the contingent of people, who used highly lethal methods of self-harm.

Keywords: cholesterol, low-density lipoproteins, high-density lipoproteins, triglycerides, parasuicide.

■ ВВЕДЕНИЕ

В 1990 году в публикации M.F. Muldoon et al. [1] отмечалось, что существенное уменьшение числа смертельных случаев от коронарной недостаточности при снижении повышенного уровня общего холестерина (ОХС) сыворотки крови у лиц среднего возраста путем применения диетических мероприятий, лекарственной терапии или обоих способов одновременно сопровождалось существенным увеличением смертельных эпизодов от несчастных случаев, убийств и самоубийств пациентов. В дальнейшем появились многочисленные исследования, которые как подтверждали данный тезис [2–4], так и констатировали отсутствие непосредственной связи между суицидальным поведением

и содержанием ОХС в крови [4, 5]. В настоящее время, несмотря на наличие убедительных данных, свидетельствующих о наличии низких показателей холестерина и его фракций у лиц, склонных к самоповреждающему поведению [3, 4], четких представлений о показателях холестерина, сопряженных с суицидальным поведением, не существует. Некоторую ясность в решение данного вопроса внесло исследование, проведенное в Восточно-Казахстанской области [6], выявившее связь между показателями содержания общего холестерина в сыворотке крови и суицидальным поведением в зависимости от возраста.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установление зависимостей между показателями содержания общего холестерина и его липопротеиновых фракций у лиц, совершивших суицидальные попытки с разной степенью выраженности к их осуществлению.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная работа выполнена на основании анализа 15 996 случаев парасуицидов и 2355 случаев суицидов (анализировались все случаи парасуицидов и суицидов в г. Минске с 2004 по 2014 год), что позволило определить демографические закономерности и особенности совершения самоповреждения лиц, склонных к суициду и парасуициду.

Среди лиц, совершивших парасуицид, преобладали лица в возрасте 20–39 лет (соотношение мужчин к женщинам – 1:1). Наиболее распространенными способами самоповреждения были порезы и медикаментозное отравление. Среди совершивших суицид преобладали лица мужского пола (75% от числа обследованных) в возрасте старше 40 лет (25% от числа обследованных); наиболее распространенный способ ухода из жизни – повешение.

На базе этих данных сформирована выборка из 160 пациентов, включающая три группы:

1. Группа лиц, использовавших высоколетальные способы самоповреждения (ГЛИВС), среди которых преобладали лица, совершившие попытку повешения или нанесшие себе глубокие ножевые повреждения области шеи, не совместимые с жизнью), – 40 человек (31 мужчина и 9 женщин).
2. Группа лиц, совершивших самоповреждения различными способами (ГЛССРС), в нее вошли лица, использовавшие наиболее распространенные способы самоповреждения, которые, как правило, не приводили к смертельному исходу (среди женщин преобладали лица, совершившие парасуицид посредством передозировки лекарственных средств, среди мужчин – совершившие не травматичные повреждения острыми предметами) – 80 человек (40 мужчин и 40 женщин).
3. Группа сравнения (ГС), в которую вошли лица, проходившие стационарное лечение в связи с диагностированным психическим заболеванием «адаптационное расстройство» и не совершавшие суицидальных попыток – 40 человек (31 мужчина и 9 женщин).

В ГС преобладали лица с диагнозом «расстройство адаптации, смешанная тревожно-депрессивная реакция» (F43.22), лишь в 2 случаях

был выставлен иной диагноз. В остальных группах отмечается более разнообразная психическая патология.

В ГЛИВС и ГЛССРС преобладали лица с диагнозом «адаптационное расстройство в виде смешанной реакции эмоций и поведения» (их общее количество в исследовательских группах составило 40% от числа обследованных). Большая часть обследованных имели сопутствующий диагноз, обусловленный злоупотреблением психоактивным веществом (в ГЛССРС – 31 человек, или 38,75%; в ГЛИВС – 18 человек, или 40%).

В 7 случаях в ГЛССРС диагностировано расстройство настроения, что составило 8,75% от общего числа обследованных, данное нарушение преобладает у лиц женского пола (5 случаев из 7 диагностированных). В ГЛИВС расстройство настроения отмечено в 2 случаях (1 случай диагностирован у мужчины и 1 – у женщины).

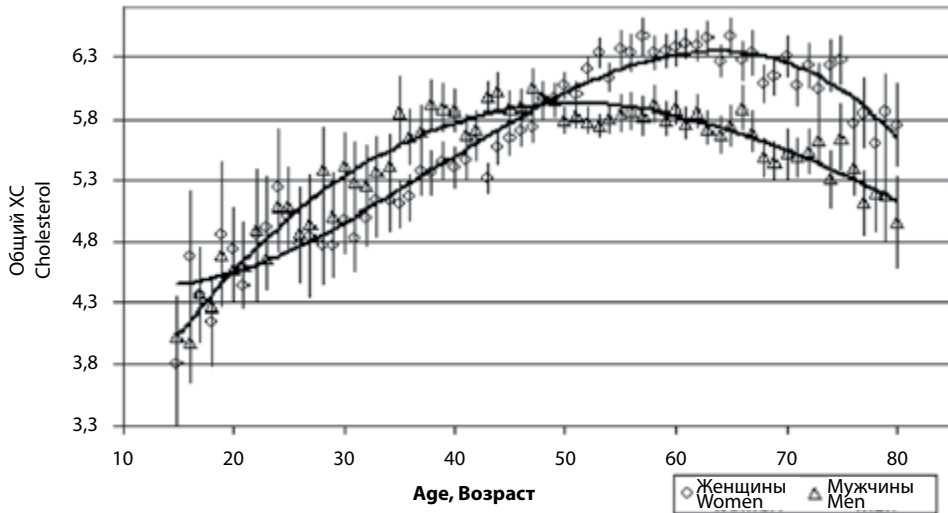
В ГЛССРС и ГЛИВС, в отличие от ГС, преобладали социально не устроенные лица (незамужние, холостые, разведенные и одиноко проживающие). В ГЛССРС они составили 77,5% от общего числа обследованных, в ГЛИВС – 65%.

В группе сравнения преобладали лица, имевшие работу (25, или 62,5%), – в отличие от контингента ГЛИВС и ГЛССРС, где большинство составили лица, не имеющие работы или вышедшие на пенсию по возрасту (ГЛИВС – 18, или 45% опрошенных; ГЛССРС – 35, или 43,75%).

Уровень перенесенного стресса оценивался по шкале Холмса и Ранге, депрессивная симптоматика – по шкале Монтгомери – Асберга, уровень суицидальной мотивации – по 10-балльной шкале. Уровень перенесенного стресса наиболее выражен в ГС – 233,4 б., при этом мотивация к совершению суицида оказалась минимальной (0,18 б.). В ГЛИВС уровень перенесенного стресса был менее выражен – 204,1 б., но более выражены были уровень депрессии – 22,4 б. (ГС – 18,6 б.) и мотивации к совершению суицида (8,36 б.). Наименее выраженный уровень депрессии и перенесенного стресса отмечался в ГЛССРС (уровень перенесенного стресса – 172,4 б., уровень депрессии – 16,2 б.; уровень мотивации к совершению суицида – 4,9 б.).

У всех обследованных пациентов было осуществлено исследование состояния липидного спектра сыворотки крови – по уровню триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП). Исследование содержания ОХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП и ТГ в сыворотке крови проводилось на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima-MS15 с использованием наборов реагентов фирмы «АнализМед». По результатам измерений вычислены коэффициенты ОХС / ХС ЛПВП и ХС-ЛПНП / ХС ЛПВП, устанавливающие отношения между этими показателями липидного обмена.

В качестве референтных значений использовались результаты биохимических исследований сыворотки крови 35 000 пациентов, постоянно проживавших в северо-восточном регионе Республики Беларусь в период 1997–2003 гг., включающие показатели содержания холестерина и его липопротеиновых фракций в сыворотке крови, характерные для жителей республики [8]. На рисунке приведены результаты исследований показателей содержания ОХС в сыворотке крови в зависимости от возраста и пола.



Зависимость изменения общего холестерина от возраста и пола

Проведенное исследование по оценке физиологических значений показателей лабораторных тестов у населения Республики Беларусь позволило прийти к заключению, что показатели ОХС и его фракций у жителей республики меняются в широком диапазоне в зависимости от возраста и пола. У мужчин в возрастном диапазоне 20–39 лет показатели ОХС колеблются от 4,52 до 5,15 ммоль/л, у женщин – от 4,53 до 5,00 ммоль/л. У мужчин более старшего возраста (45–60 лет) содержание ОХС в сыворотке крови находится на уровне 5,3 ммоль/л, у женщин оказывается более высоким – до 5,57 ммоль/л.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гипотеза о нормальном распределении показателей липидного обмена была принята во всех трех группах только для ОХС и ХС-ЛПНП. С учетом этого для поиска зависимостей по этим двум показателям выполнен параметрический тест по критерию Стьюдента, показавший статистически значимые различия средних значений концентрации ОХС и ХС-ЛПНП в сыворотке крови у представителей ГЛИВС и ГС (уровень значимости p составил 0,001, т. е. оказался меньше заданного уровня, который в данном случае с учетом поправки Бонферрони принят равным 0,015). Проверка по критерию Манна – Уитни для показателей ТГ и ХС-ЛПВП значимых различий между группами не выявила. Для коэффициентов ОХС / ХС ЛПВП и ХС-ЛПНП / ХС ЛПВП проверка по этому критерию показала наличие значимых различий между ГС и ГЛССРС, ГС и ГЛИВС.

При сопоставлении показателей липидного обмена у пациентов ГЛИВС и ГЛССРС ни по одному из них значимых различий не обнаружено.

Наиболее высокие средние значения показателей липидного обмена (исключение составил показатель ХС-ЛПВП) наблюдались в ГС, наиболее низкие (исключение составил показатель ТГ) – в ГЛИВС (табл. 1). Значения коэффициентов ОХС / ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП / ХС-ЛПВП в ГЛССРС и ГЛИВС примерно одинаковы, в ГС – значительно выше.

Показатели холестерина и его липопротеиновых фракций в исследовательских группах различались в зависимости от пола. Так, значения ОХС и ХС-ЛПВП у женщин выше, чем у мужчин, во всех группах, а значения ХС-ЛПНП – только в ГЛССРС и ГЛИВС. При этом статистически значимые различия по показателям ОХС и ХС-ЛПНП между ГЛИВС и ГС, между ГЛССРС и ГС обнаружены только у мужчин. Это можно объяснить, в частности, тем, что женские выборки значительно меньше по объему.

Между показателями ОХС и ХС-ЛПНП отмечается высокий уровень корреляционной зависимости во всех трех исследовательских группах (табл. 2).

Показатели содержания холестерина и его липопротеиновых фракций в исследовательских группах отличаются также в зависимости от возраста.

Дальнейшему анализу были подвергнуты выборки мужчин в возрасте 20–39 и 47–69 лет, для которых характерен пик суицидальной активности (лица до 39 лет преобладали среди тех, кто совершил парасуицид; лица в возрасте 47–60 – среди тех, кто совершил суицид). Из данных табл. 3 следует, что средние значения ОХС ниже референтных значений во всех исследовательских группах, однако особенно сильно это выражено у пациентов ГЛССРС и ГЛИВС. Так, для мужчин 20–39 лет среднее

Таблица 1
Средние значения биохимических показателей пациентов ГС, ГЛССРС и ГЛИВС

Исследуемые показатели	ГС			ГЛССРС			ГЛИВС		
	муж.	жен.	всего	муж.	жен.	всего	муж.	жен.	всего
ТГ, ммоль/л	1,61	1,05	1,49	1,10	1,26	1,18	1,31	0,91	1,20
ОХС, ммоль/л	4,59	4,66	4,60	3,55	4,07	3,81	3,50	3,82	3,59
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,05	1,10	1,06	1,09	1,20	1,15	0,99	1,20	1,05
ХС-ЛПНП, ммоль/л	2,80	2,74	2,79	1,95	2,28	2,12	1,90	2,21	1,98
ОХС / ХС-ЛПВП	4,76	4,99	4,81	3,58	3,82	3,70	3,84	3,38	3,72
ХС-ЛПНП / ХС-ЛПВП	2,96	2,97	2,96	2,05	2,14	2,09	2,16	1,98	2,12

Таблица 2
Корреляционные зависимости между показателями липидного обмена

Коэффициент корреляции	ГС			ГЛССРС			ГЛИВС		
	муж.	жен.	всего	муж.	жен.	всего	муж.	жен.	всего
ОХС/ТГ	0,294	0,251	0,295	0,335*	0,176	0,238*	0,110	-0,055	0,012
ОХС/ХС-ЛПНП	0,903*	0,899*	0,895*	0,875*	0,839*	0,857*	0,854*	0,858*	0,845*
ОХС/ХС-ЛПВП	0,190	0,045	0,139	0,079	0,368	0,285*	-0,004	0,715*	0,293
ХС-ЛПНП/ТГ	-0,036	-0,003	-0,011	0,161	-0,157	-0,037	-0,252	-0,210	-0,283
ХС-ЛПВП/ТГ	-0,224	0,153	-0,181	-0,229	-0,319	-0,269	-0,121	-0,383	-0,243

Примечание: * корреляция значима на уровне 0,05.

Таблица 3
Средние значения биохимических показателей мужчин в возрасте 20–39 лет и 47–60 лет

Исследуемые показатели	ГС		ГЛССРС		ГЛИВС	
	20–39 лет	47–60 лет	20–39 лет	47–60 лет	20–39 лет	47–60 лет
ТГ, ммоль/л	1,58	1,38	1,07	1,13	1,20	1,33
ОХС, ммоль/л	4,09	4,89	3,45	3,69	3,01	3,58
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,03	1,09	1,11	1,00	0,94	1,15
ХС-ЛПНП, ммоль/л	2,34	3,17	1,85	2,18	1,49	1,82
ОХС/ХС-ЛПВП	4,33	5,30	3,44	4,26	3,48	3,64
ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП	2,52	3,57	1,91	2,66	1,74	2,00

значение ОХС в ГЛССРС (3,45 ммоль/л) меньше нижнего референтного значения для этой возрастной группы (4,52 ммоль/л) на 23,7%, а в ГЛИВС (3,01 ммоль/л) – на 33,4%. Для мужчин 47–60 лет разница с референтным значением (5,3 ммоль/л) в ГЛССРС и ГЛИВС (3,69 ммоль/л и 3,58 ммоль/л) составляет соответственно 30,4% и 32,5%.

Оценка показателя ОХС и его липопротеиновых фракций у лиц мужского пола в возрасте 20–39 лет подтвердила основные выводы, сформулированные при анализе выборки в целом. Отмечены статистически значимые различия по показателю ОХС между ГЛИВС и ГС, ГЛССРС и ГС, а также по показателю ХС-ЛПНП между ГС и ГЛИВС с некоторым ухудшением значимости в связи с меньшим объемом выборки. Не обнаружены статистически значимые различия между показателями у пациентов ГЛИВС и ГЛССРС. Для выборки 47–69 лет проверка значимости связей не проводилась ввиду относительной малочисленности в ней исследовательских групп.

Следует также отметить уменьшение средних значений ОХС и ХС-ЛПНП, а также коэффициента ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП и с небольшим исключением коэффициента ОХС/ХС-ЛПВП в ГЛИВС по сравнению с ГЛССРС, что для мужчин в рамках всей выборки не наблюдалось.

Уровень корреляции, как и в целом по выборке, наиболее высок между показателями ОХС и ХС-ЛПНП, однако максимальные значения

Таблица 4
Корреляционные зависимости между показателями липидного обмена у мужчин в возрасте 20–39 и 47–60 лет

Коэффициент корреляции	ГС		ГЛССРС		ГЛИВС	
	20–39 лет	47–60 лет	20–39 лет	47–60 лет	20–39 лет	47–60 лет
ОХС/ТГ	-0,104	0,492	0,234	0,635	-0,700	-0,061
ОХС/ХС-ЛПНП	0,881*	0,852*	0,898*	0,778*	0,950*	0,896*
ОХС/ХС-ЛПВП	0,204	0,102	0,104	-0,124	0,302	-0,198
ХС-ЛПНП/ТГ	-0,397	0,146	0,090	0,294	-0,655	-0,188
ХС-ЛПВП/ТГ	-0,245	-0,283	-0,349	0,045	-0,685	-0,213

Примечание: * корреляция значима на уровне 0,05.

коэффициентов корреляции сместились от ГС к ГЛИВС (табл. 4). Отмечены относительно высокие отрицательные коэффициенты корреляции между уровнем содержания триглицеридов и остальными показателями в ГЛИВС у мужчин 20–39 лет.

Анализ состояния метаболических изменений в подгруппе пациентов с более высокой, чем в целом по выборке, суицидальной активностью подтвердил наличие связи между сниженными значениями ОХС и склонностью пациентов к совершению суицидов. Кроме того, анализ выявил следующие тенденции, касающиеся возможных различий между группами пациентов с разным суицидальным поведением:

- снижение средних значений ОХС и ХС-ЛПНП в ГЛИВС по сравнению с ГЛССРС;
- снижение средних значений коэффициентов, выражающих отношения между показателями липидного обмена, в ГЛИВС по сравнению с ГЛССРС;
- рост положительной корреляционной зависимости между ОХС и ХС-ЛПНП в ГЛИВС;
- возникновение отрицательной корреляционной зависимости между триглицеридами и остальными показателями липидного обмена в подгруппе молодых мужчин ГЛИВС.

В свете полученных данных обращают на себя внимание данные литературы о том, что уменьшение концентрации холестерина сыворотки крови наблюдается при поражениях центральной нервной системы [9]. Однако ранее взаимосвязь между низкими значениями показателя ХС-ЛПНП и суицидальным поведением в научной литературе не рассматривалась, также как и влияние взаимосвязи ОХС и ХС-ЛПНП на формирование суицидального поведения, что и могло быть причиной получения противоречивых результатов при проведении исследований, направленных на установление взаимосвязи между ОХС и суицидальным поведением.

Данное исследование обращает внимание на возможную роль ХС-ЛПНП в формировании суицидального поведения.

■ ВЫВОДЫ

1. Проведенное исследование показало, что для лиц, склонных к суицидальному поведению, характерны более низкие показатели ОХС и ХС-ЛПНП по сравнению с аналогичными показателями у лиц, суицидальных попыток не совершивших, но имеющих диагноз «расстройство адаптации». У мужчин исследованных групп показатели ОХС оказались ниже возрастных норм, характерных для жителей республики, однако наибольшие отличия от референтных значений отмечены в группах лиц, использовавших высоколетальные способы самоповреждения.
2. В основе снижения содержания ОХС сыворотки крови лежит уменьшение уровня ХС-ЛПНП: все остальные показатели липопротеинового распределения холестерина не претерпевают при этом существенных изменений.
3. Полученные данные позволяют предположить, что снижение уровня ХС-ЛПНП отражает либо обуславливает нарушение структурно-

функциональных свойств клеточных элементов ткани центральной нервной системы у лиц, склонных к совершению суицидальных попыток.

Благодарность

Коллектив авторов отмечает большой вклад профессора Камышникова В.С. в написание данной статьи.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ **ЛИТЕРАТУРА**

1. Muldoon M.F. (1990) Lowering cholesterol concentrations and mortality: a quantitative review of primary prevention trials. *B.M.J.*, vol. 301, pp. 309–314.
2. Chen Z. (1991) Serum cholesterol concentration and coronary heart disease in population with low cholesterol concentrations. *B.M.J.*, vol. 303, pp. 276–282.
3. Rozanov V.A., Mid'ko A.A. (2006) Systemic lipid metabolism and suicidal behavior. *Nejronauki*, no 4 (6), pp. 3–13.
4. Dwivedi Y. (2012) *The Neurobiological Basis of Suicide*. University Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 482 p.
5. Markovitz J.H. (1997) Lack of relation of hostility, negative affect and high-risk behavior with low plasma lipid levels in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Archives of Internal Medicine.*, vol. 157, pp. 1953–1959.
6. Danbaev S.U. (2009) The relationship between cholesterol in the blood and suicidal behavior. *Valeologija*, no 1, pp. 5–8.
7. Grjibovski A. M. (2008) Analysis of quantitative data for two independent groups. *Human Ecology*, no 3, pp. 50–58.
8. Chirkin A.A. (2010) *Physiological values of laboratory tests in the population of the Republic of Belarus*. Minsk: Adukatsy i vykhavanne. (in Russian)
9. Kamyshnikov V.S. (2002) *Pocket reference book for laboratory diagnostics*, Minsk: Bel. navuka. (in Russian)

Поступила/Received: 18.10.2019
Контакты/Contacts: davidouski@yandex.by

Митюкова Т.А.¹, Докукина Т.В.², Полулях О.Е.¹, Захаревич О.Ю.², Мартыненко А.И.²

¹ Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Беларусь

Mityukova T.¹, Dokukina T.², Polulyakh O.¹, Zakharevich O.², Martynenko A.²

¹ Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Republican Research and Practice Center for Mental Health, Minsk, Belarus

Особенности изменения показателей состояния воспалительного и аутоиммунного процессов у детей с аутизмом и нарушениями психоречевого развития органического генеза

Features of Changing Indicators of the State of Inflammatory and Autoimmune Processes in Children with Autism and Impaired Psycho-Speech Development of Organic Origin

Резюме

Цель. Установление характера изменения состояния воспалительного и аутоиммунного процессов у пациентов с аутизмом и у детей с нарушениями психоречевого развития вследствие органического поражения центральной нервной системы.

Материалы и методы. Проведено клинично-психологическое и лабораторно-диагностическое обследование пациентов с нарушением психоречевого развития: детей с аутизмом – 24 ребенка, составивших основную группу наблюдения, и детей группы сравнения – с нарушениями психоречевого развития в связи с органическим поражением ЦНС (32 ребенка). В группу контроля включены 20 практически здоровых детей. Возраст детей во всех группах варьировал от 3 до 12 лет.

В сыворотке крови определяли эластазоподобную активность, содержание ингибитора альфа-1-антипротеазного и С-реактивного белка, противовоспалительного нейтрофильного белка програнулина и антител к основному белку миелина (АТ-ОБМ) и белку S100b (АТ-S100b).

Результаты и обсуждение. У детей группы сравнения медиана содержания АТ-ОБМ была достоверно ниже, чем в группах контроля и аутизма, а медиана АТ-S100b была достоверно ниже, чем в группе контроля. Резко сниженные значения АТ-ОБМ достоверно чаще встречались в группе сравнения (50%) по отношению к таковым в группе контроля (15%). Многокомпонентные сдвиги изучаемых показателей (3–4 отклонения, включающие програнулин, антитела к нейробелкам и др.) встречались у детей с аутизмом в 13% случаев и полностью отсутствовали в других группах детей. Двухкомпонентные сдвиги (включая програнулин и антитела к нейробелкам) преобладали в группе сравнения (47%), что достоверно отличалось от группы контроля (15%). Полученные нами данные согласуются с представлениями о том, что аномально сниженные уровни антител к нейробелкам и медиаторам, так же как и повышенные, могут отражать неблагоприятные процессы в нервной системе.

Выводы. У детей с аутизмом выявлены наиболее многочисленные сочетанные сдвиги показателей, отражающих состояния воспаления, протеолиза и формирование антител к белкам

нервной ткани – основному белку миелина и белку S100b. Такие показатели, как програнулин, AT-ОБМ и AT-S100b, представляют большой интерес для оценки различных нарушений психоречевого развития у детей.

Ключевые слова: аутизм, нарушения психоречевого развития у детей, провоспалительные показатели крови, антитела к нейробелкам.

Abstract

Purpose. To study proinflammatory and autoimmune features in patients with autism and in children with impaired psychological and speech development due to organic lesions of the central nervous system.

Materials and methods. There was conducted a clinical-psychological diagnostics of the following patients: 24 children with autism (main group); 32 children with impaired psychological and speech development in connection with organic lesions of the central nervous system (comparison group), and 20 healthy children. The age of children in all groups ranged from 3 to 12 years. In the blood serum, there were determined the following indicators of inflammation: elastase activity, alpha1-antiprotease inhibitor and C-reactive protein, proinflammatory neurotrophin – progranulin and antibodies to myelin basic protein (AB-MBP) and S100b protein (AB-S100b).

Results and discussion. In children of the comparison group, the median of content of AB-MBP was significantly lower than in the control and autism groups, and the median AB-S100b was significantly lower than in the control group. Sharply reduced values of AB-MBP were significantly more common in the comparison group (50%), if compared to those in the control group (15%). Multicomponent shifts of the studied parameters (3–4 abnormalities, including progranulin, antibodies to neuropeptides et al.) were found in children with autism in 13% of cases and completely absent in other groups of children. Two-component shifts (including progranulin and AB-MBP, AB-S100b) prevailed in the comparison group (47%), which differed significantly from the control group (15%). Our findings are consistent with the notion that the abnormally reduced levels of antibodies to neuropeptides as well as the increased levels may reflect the adverse processes in the nervous system.

Conclusions. The most numerous combined shifts of the studied indicators were observed in children with autism. Such indicators as progranulin, AB-MBP and AB-S100b are of great interest for assessment of various disorders of psycho-speech development in children.

Keywords: autism, disorders of psycho-speech development in children, proinflammatory blood parameters, antibodies to neuropeptides.

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общие расстройства психологического развития (рубрика F84 по МКБ-10), к которым относится и детский аутизм, рассматриваются как нарушения, формирующиеся на ранних стадиях развития ребенка. Для этих расстройств типичны психологические и психические нарушения, охватывающие социальное взаимодействие, вербальную и невербальную коммуникацию, стереотипное поведение, снижение интеллектуального уровня, воображения, а также крайне ограниченный репертуар/спектр видов активности и интересов [1, 2]. Наряду с этим у пациентов с детским аутизмом часто присутствуют патологические изменения в различных системах и органах, включая иммунную систему. Существует гипотеза, что дисбаланс в иммунной системе может приводить к хроническому неспецифическому воспалению в организме,

что отражается на состоянии центральной нервной системы [3–6]. В современных исследованиях прослеживается взаимосвязь между отклонениями в иммунной системе и психическими и неврологическими заболеваниями. Предполагается, что пренатальные инфекции, активация материнского иммунитета и гипоксия могут вызывать изменения в развитии нервной системы плода, что повышает риск аутизма [3–6]. В работе [7], проведенной с использованием оригинальной методики «ЭЛИ-Нейро-тест» (Иммункюлус, Россия), показана активация аутоиммунных процессов у детей с аутизмом и у их матерей. Изучение показателей врожденного и приобретенного иммунитета у детей с психотическими формами аутизма и у взрослых пациентов с психозами [8, 9] выявило у них нарастание активности лейкоцитарной эластазы и ее ингибитора, а также уровней некоторых нейроспецифических антител. В ряде работ, выполненных с применением различных коммерческих иммуноферментных ИФА-тест-систем [10], также были обнаружены повышенные уровни антител к нейроспецифическим белкам у пациентов с аутизмом.

Основной белок миелина (ОБМ) является одним из ключевых белков ЦНС, обеспечивающим защиту и формирование структуры нервных волокон, проведение нервного импульса по аксонам. Известно, что демиелинизирующие процессы происходят, как правило, на фоне деструкции ОБМ [11], причем антитела к основному белку миелина (АТ-ОБМ) играют важную роль в регуляции процесса миелинизации в аксонах ганглиозных клеток ЦНС [11]. Белок S100b синтезируется в основном астроцитами и клетками микроглии, участвует во многих внутри- и внеклеточных процессах. В частности, показано, что S100b стимулирует дифференцировку и пролиферацию нейронов, рост дендритов, влияет на целостность цитоскелета, увеличивает выживаемость нейронов, участвует в трансдукции Ca^{2+} -сигнала [12]. Специфическими модуляторами функции белка являются аутоантитела [12]. Одним из механизмов, контролирующих активацию нейтрофилов в процессе развития воспалительных реакций, является выделение белка програнулина из различных органов и тканей, включая нервную систему [13, 14]. Показано, что в нервной ткани он играет нейротрофическую роль, подавляет воспалительные процессы и ускоряет регенерацию после повреждающих воздействий [13]. Изучение его вклада в развитие аутизма пока находится на начальной стадии [14].

Следует отметить, что опубликованные данные, характеризующие особенности иммунитета при аутизме, не всегда носят однозначный характер, а зачастую и противоречат друг другу. Упущением этих работ, как правило, является отсутствие сравнения изучаемых показателей при аутизме с таковыми при других заболеваниях, включающих нарушения психоречевого развития у детей. Большой интерес представляет сопоставление провоспалительных и аутоиммунных показателей не только у детей с аутизмом и у практически здоровых детей, но также и у детей с органическими поражениями головного мозга. Нарушения органического генеза наиболее часто наблюдаются при перинатальных воздействиях на ЦНС в результате интоксикаций, травм, нейроинфекций, гипоксии и др. Стоит отметить, что клиническая картина в этих случаях может иметь аутистическую симптоматику.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить характер изменения состояния воспалительного и аутоиммунного процессов у пациентов с аутизмом и у детей с нарушениями психоречевого развития вследствие органического поражения центральной нервной системы.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведена клиничко-психологическая диагностика пациентов основной группы (дети с аутизмом) – 24 ребенка, группы сравнения (дети с нарушениями психоречевого развития в связи с органическим поражением ЦНС) – 32 ребенка. Группа контроля включала 20 практически здоровых детей (в том числе 2 братьев пациентов). Дополнительно была сформирована группа «чистого контроля», которая исключала родственников пациентов (n=18). Возраст детей во всех группах составлял от 3 до 12 лет. Соотношение мальчиков и девочек было примерно 10/2 соответственно.

Для оценки клинических особенностей и степени выраженности нарушений психоречевого развития использовалась детская рейтинговая шкала оценки аутизма – CARS (Childhood Autism Rating Scale). Шкала CARS включает 15 параметров, описывающих все значимые для обследования характеристики ребенка, позволяет оценить степень аутистических проявлений у ребенка, вне зависимости от причины, которая их вызвала, и возможных маскирующих факторов. Выраженность (степень) аутизма определялась в баллах: 31–33 балла – легкая степень, 34–36 баллов – умеренная, 37–60 баллов – резко выраженный аутизм.

При обращении за специализированной помощью в РНПЦ психического здоровья (Минск) родителям (опекунам) были разъяснены цели и задачи проводимого исследования, после чего подписывалось информированное согласие, и ребенок проходил диагностику по разработанному алгоритму. Клиническая и патопсихологическая диагностика пациентов основной группы, группы сравнения и группы контроля включала консультацию врача – психиатра-нарколога, педиатра, медицинского психолога, логопеда-дефектолога и других специалистов по показаниям в соответствии с протоколом диагностики оказания медицинской помощи пациентам с психическими и поведенческими расстройствами.

Критерием включения в основную группу было наличие диагноза «аутизм» по МКБ-10 (F84). В группу сравнения включались дети, имеющие нарушения психоречевого развития вследствие органического поражения ЦНС. В группе сравнения присутствовали дети с расстройствами психологического развития (F80-F89), нарушениями активности и внимания (F90-F99), другими психическими расстройствами, обусловленными повреждением и дисфункцией головного мозга или соматической болезнью (F06), расстройствами личности и поведения, обусловленными болезнью, повреждением или дисфункцией головного мозга (F07).

Взятие крови проводили в утреннее время натощак из локтевой вены. Сыворотку крови хранили при –20 °С до момента проведения лабораторных исследований (не более 3 мес.). Лабораторные методы

включали определение маркеров воспаления: эластазоподобной активности сыворотки крови (ЭПА), альфа-1-антипротеазного ингибитора (альфа-1-ПИ) [8, 9], С-реактивного белка (СРБ) с применением наборов НТПК «Анализ Х» (Минск, Беларусь). В качестве противовоспалительного агента рассматривали белок програнулин [11, 12], который определяли в крови ИФА-методом с использованием наборов Elabscience (Китай). Показатели аутоиммунизации оценивали ИФА-методом по уровням антител к белку S100b (АТ-S100b) и к основному белку миелина (АТ-ОБМ) в сыворотке крови на наборах Cusabio (Китай).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0 с использованием непараметрических методов, т. к. распределение не всегда носило нормальный характер. Результаты представлены преимущественно в виде медиан (Me) и процентилей [25; 75], а также в виде долей (%). При сравнении средних статистических характеристик применяли критерий Манна – Уитни, а при сравнении долей (%) – критерий хи-квадрат.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка выраженности аутистических признаков по шкале CARS выявила достоверные отличия между группой аутизма и группой сравнения (Me [25; 75]: 31,0 [29,0; 33,5] и 18,0 [16,5; 21,0] соответственно; $P < 0,05$). В группе практически здоровых детей аутистические проявления и другие признаки отклонений в психоречевом развитии отсутствовали.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, медианы активностей ЭПА и альфа-1-ПИ, а также содержания СРБ и програнулина в сыворотке крови не имели достоверных отличий у детей обследованных групп.

Изучение аутоиммунной отягощенности включало определение АТ-ОБМ и АТ-S100b. Полученные данные оказались неожиданными: в группе сравнения медиана содержания АТ-ОБМ была достоверно ниже, чем в группах контроля и аутизма. Значения АТ-S100b в этой группе пациентов тоже были достоверно ниже, чем в группе контроля. Анализ частоты

Таблица 1

Средние значения (Me [25; 75]) провоспалительных и аутоиммунных показателей у детей основной группы (аутизм), группы сравнения и контроля

Показатель	Основная группа	Группа сравнения	Группа контроля
ЭПА, МЕ/мл Норма: 200–340	281,5 [253,5; 295,5]	274,4 [242,0; 313,0]	269,0 [256,0; 284,0]
Альфа-1-ПИ, ИЕ/мл Норма: 20–40	29,0 [25,0; 33,0]	27,6 [23,0; 33,0]	27,0 [25,0; 31,0]
СРБ, мг/л Норма: 0–6	0,40 [0,30; 0,80]	0,30 [0,10; 0,60]	0,25 [0,10; 0,40]
Програнулин, нг/л	36,1 [25,0; 58,8]	37,5 [30,5; 60,7]	33,2 [26,0; 49,5]
АТ-ОБМ, мкг/л	93,9 [36,4; 164,0]	33,8 [22,5; 67,2]*, ^	70,9 [48,4; 164,5]
АТ-S100b, мкг/л	58,0 [52,2; 67,7]	58,2 [42,5; 66,7]*	66,5 [53,3; 76,2]

Примечания:

* различия статистически значимы относительно группы контроля, $P < 0,05$;

^ различия статистически значимы относительно группы аутизма, $P < 0,05$.

Таблица 2

Частота встречаемости (%) повышенных и сниженных значений програнулина, АТ-ОБМ и АТ-S100b у детей основной группы (аутизм), группы сравнения и контроля, выходящих за пределы [25–75] процентилей от нормы

Группа	Програнулин, %		АТ-ОБМ, %		АТ-S100b, %	
	>[75]	<[25]	>[75]	<[25]	>[75]	<[25]
Аутизм	20	28	25	30	8	21
Гр. сравнения	23	17	6	50*	6	22
Контроль	15	15	25	15	10	10

Примечание:

* различия статистически значимы относительно группы контроля, $P < 0,05$.

повышенных и сниженных значений изучаемых показателей выявил достоверное преобладание сниженных значений АТ-ОБМ в группе сравнения (табл. 2).

Как известно, в публикациях об аутизме и других психических и неврологических нарушениях доминирует мнение о том, что нарастание в крови уровня антител к медиаторам и нейробелкам следует рассматривать как проявление активности патологического процесса [3–10]. Однако есть упоминания [7], что у детей и взрослых с различными формами психических и неврологических заболеваний могут выявляться как аномально высокие, так и аномально низкие уровни антител к нейроспецифическим белкам. За последние годы накапливаются сведения о защитной/превентивной роли некоторых антител при ряде патологических состояний [16–19]. Например, интраназальное введение антител к глутамату в эксперименте приводит к нормализации когнитивных функций у стареющих крыс [16, 17], а также предупреждает развитие негативных последствий стресса и нормализует содержание нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга животных [18]. Показано, что молодые люди, ведущие здоровый образ жизни, отличаются максимально высокими уровнями антител к дофамину, норадреналину и глутамату по сравнению со сверстниками, испытывающими влечение к наркотикам [19]. Пониженный уровень этих антител в крови может служить предиктором тяги к наркотическим веществам [19]. Экспериментальные исследования демонстрируют противотревожную и антистрессорную активность препаратов антител к белку S100 [12]. Что касается АТ-ОБМ, которые участвуют в развитии демиелинизирующих заболеваний центральной и периферической нервной системы, то показано, что при глаукоме на стадии манифестации заболевания с высокой частотой встречаются повышенные уровни АТ-ОБМ в сыворотке крови, а на стадиях прогрессии преобладают аномально низкие значения [20]. По мнению авторов, повышение АТ-ОБМ обусловлено стимуляцией антителопродукции при избытке антигена, а снижение может быть объяснено их расходом на связь с основным белком миелина [20]. Полученные нами данные согласуются с представлениями о том, что аномально сниженные уровни антител к нейробелкам и медиаторам, так же как и повышенные, могут отражать неблагоприятные процессы в нервной системе.

Не вызывает сомнений, что выявление специфических маркеров аутизма либо других нарушений психоречевого развития является крайне сложной задачей, и в современной литературе встречаются противоречивые сведения в этой области. Например, J.E. Libbey et al. [21] не выявили достоверных отличий содержания АТ-ОБМ в сыворотке крови у детей с аутизмом и в группе контроля, но при этом зафиксировали сниженные значения показателя в группе сравнения – у детей с другими формами расстройств психоречевого развития (синдром Туретта). Авторы работы [21] обращают внимание на большие фенотипические отличия пациентов с диагнозом «аутизм», что может быть причиной неоднозначных результатов разных авторов. Полученные нами данные близки к вышеприведенным [21], поскольку на данном этапе исследования не было выявлено достоверных отличий между группами контроля и аутизма. Однако имело место снижение уровня АТ-ОБМ у детей с другими нарушениями психоречевого развития. Что касается противоречивых и дискуссионных аспектов, то они могут быть связаны не только с особенностями пациентов, но также с использованием разных методов определения антител.

Учитывая фенотипическую неоднородность пациентов с диагнозом «аутизм», представлялось целесообразным проанализировать индивидуальные отклонения изучаемых показателей. Сдвиги «провоспалительных» параметров были немногочисленными. Отмечены единичные значения уровня альфа-1-ПИ, выходящие за пределы нормы: при аутизме у 2 детей, а в группе сравнения у 1 ребенка.

В группе детей с аутизмом у 1 ребенка (В. Г., возраст 3 года) обнаружено уникальное сочетание 4 отклонений: повышение содержания СРБ, альфа-1-ПИ, а также АТ-ОБМ и резкое снижение програнулина, что свидетельствует о наличии хронического воспалительного процесса и снижении противовоспалительного протекторного действия програнулина. История рождения ребенка В. Г. описывает неблагоприятно протекающую беременность, инфекционные заболевания матери, прием антибактериальной терапии. На 7-й неделе было кровотечение, на 34-й – многоводие и на 38-й неделе – кесарево сечение. Ребенок родился с гипоксией мозга и врожденной двусторонней пневмонией, в настоящее время у него отмечаются умеренно выраженные признаки аутизма по шкале CARS (36 баллов). Дефицит програнулина считается неблагоприятным прогностическим фактором, поскольку на фоне этого дефицита развивается нейровоспаление и гибель нервных клеток [22]. Резко сниженные уровни програнулина наиболее часто отмечались нами у детей с аутизмом – в 28% случаев (табл. 2), что согласуется с данными, представленными в исследовании Al-Ayadhi L.Y. [15].

Как видно из данных табл. 3, многокомпонентные сдвиги (3–4 отклонения) определяемых показателей регистрировались только при аутизме (13%), что достоверно отличалось от группы сравнения. Например, при аутизме регистрировались такие сдвиги, как снижение програнулина и повышение АТ-ОБМ и АТ-S100b или снижение програнулина и снижение АТ-ОБМ и АТ-S100b. При аутизме отмечались также и 2-компонентные сдвиги, которые регистрировались у 25% детей (табл. 3). Например, сниженные значения АТ-ОБМ проявлялись совместно со сниженными значениями АТ-S100b.

Таблица 3

Частота встречаемости (%) одиночных, двухкомпонентных и многокомпонентных сдвигов у детей основной группы (аутизм), группы сравнения и контроля, выходящих за пределы [25–75] процентилей

Группа	Одиночные сдвиги, %	Двухкомпонентные сдвиги, %	Трех-четырёхкомпонентные сдвиги, %
Аутизм, n=24	54	25	13 [^]
Гр. сравнения, n=32	41	47*	0
Контроль, n=20	45	15	0
«Чистый контроль», n=18	38	6	0

Примечания:

* различия статистически значимы относительно группы контроля, $P < 0,05$;

[^] различия статистически значимы относительно группы сравнения, $P < 0,05$.

В группе сравнения наиболее характерными отклонениями, встречающимися у половины детей, были сниженные уровни АТ-ОБМ, причем у большинства детей эти сдвиги сочетались со снижением програнулина или АТ-S100b, т. е. были двухкомпонентными (47%) (табл. 3). Частота 2-компонентных отклонений была наиболее высокой в группе сравнения и достоверно отличалась от контроля.

Следует отметить, что одиночные отклонения встречались почти с одинаковой частотой во всех обследованных группах, включая контроль, и составляли 41–54% (табл. 3).

В группе контроля также были выявлены единичные сниженные значения АТ-ОБМ, которые регистрировались совместно с аналогичными сдвигами програнулина или АТ-S100b (3/20 – 15%). Однако 2 человека с такими 2-компонентными сдвигами были практически здоровыми мальчиками – братьями пациентов из группы сравнения. Если исключить этих детей и учитывать данные «чистого контроля», то тогда доля 2-компонентных сдвигов снижается до 6% (табл. 3, «Чистый контроль»).

Таким образом, можно предположить, что уменьшение значений АТ-ОБМ/АТ-S100b за пределы нормы (менее 25-го перцентиля) является одним из признаков либо предикторов нарушений психоречевого развития у детей, особенно если они сочетаются со сниженным уровнем програнулина. Однако динамика сдвигов аутоиммунных процессов может отличаться в зависимости от стадии заболевания, а также от фенотипических особенностей пациентов.

В настоящее время провоспалительные и иммунологические характеристики аутизма активно изучаются с использованием молекулярно-генетических методов исследования, однако единая теория аутизма до сих пор отсутствует [3–15]. В заключение следует отметить, что рутинные параметры острой фазы воспаления (ЭПА, альфа-1-ПИ и СРБ) оказались малоинформативными. Выявленные изменения показателей уровня програнулина, АТ-ОБМ и АТ-S100b привлекают особое внимание к тестам их определения у детей для оценки различных нарушений психоречевого развития у детей. Несомненно, что антитела к нейроспецифическим белкам играют важную роль в регуляции биологической активности соответствующих белков, однако выяснение их конкретной роли требует дальнейших исследований.

■ ВЫВОДЫ

1. Использование тестов определения эластазоподобной активности крови, ингибитора альфа-1-антитрипсина, СРБ и програнулина не выявило достоверных изменений в состоянии воспалительного и аутоиммунного процессов у детей с аутизмом, нарушением психоречевого развития вследствие органического поражения ЦНС и у практически здоровых детей.
2. У детей с нарушениями психоречевого развития на почве органического поражения нервной системы медиана содержания антител к основному белку миелина оказалась достоверно ниже таковой в группах практически здоровых детей и детей с аутизмом. Медиана значений содержания антител к белку S100b в этой группе пациентов была достоверно ниже, чем в группе практически здоровых детей. Резко сниженные значения АТ-ОБМ (менее 25-го перцентилля) преобладали в группе детей с органическими нарушениями психоречевого развития (50%) по сравнению с группой контроля.
3. Многокомпонентные сдвиги изучаемых показателей (3–4 отклонения, включающие оценку содержания програнулина и антитела к нейробелкам) встречались у детей с аутизмом в 13% случаев и полностью отсутствовали в других группах детей. Двухкомпонентные сдвиги (включая уровень антител к нейробелкам) преобладали в группе сравнения (47%), что достоверно отличалось от группы контроля.
4. Наиболее многочисленные сочетанные сдвиги изучаемых показателей выявлены у детей с аутизмом. Использование тестов определения програнулина, АТ-ОБМ и АТ-S100b представляется весьма перспективным для оценки различных нарушений психоречевого развития у детей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Wing L. (1980) Childhood autism and social class: a question of selection? *British Journal of Psychiatry*, vol. 137, pp. 410–417.
2. (1998) *Mezhdunarodnaya statisticheskaya klassifikaciya boleznej i problem, svyazannyh so zdorov'em. Desyatij peresmotr (МКБ-10). ВОЗ, Швейцария, Женева. Russkij perevod* [International statistical classification of diseases and related health problems. 10th revision (ICD-10). WHO, Switzerland, Geneva. Russian translation]. М.: Medicina, 1, part 1, 698 p., 1, part 2, 633 p., 2, 179 p., 3, 429 p.
3. Dipasquale V. (2017) Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorders: Role of High Mobility Group Box 1 Protein. *Int.J. Mol.Cell. Med.*, vol. 6, pp. 148–155.
4. Bjorklund G. (2016) Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*, vol. 76, pp. 257–268.
5. Szachta P. (2016) Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 20, pp. 3060–3072.
6. De Cossno L.F. (2017) Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. *Brain Behav. Immun.*, vol. 63, pp. 88–98.
7. Cahilova S. (2017) *Vliyaniye materinskih autoantitel na formirovaniye nervnoj sistemy rebenka* [Effect of maternal autoantibodies on the formation of the nervous system of child]. *Doktor.Ry*, 4, pp. 30–33.

8. Klyushnik T. (2011) Sostoyanie vrozhdenного i priobretenного immuniteta u detej s psihotichesкими formami rasstrojstv avtisticheskogo spektra [The state of innate and acquired immunity in children with psychotic forms of disorders of autistic spectrum]. *ZHurnal nevrologii i psihiatrii*, 8, pp. 41–45.
9. Klyushnik T. (2014) Immunologicheskij monitoring endogennyh pristupoobraznyh psihozov [Immunological monitoring of endogenous paroxysmal psychosis]. *ZHurnal nevrologii i psihiatrii*, 2, pp. 37–41.
10. Singla K. (2017) A review on approaches to diagnose the autism spectrum disorder: the need of the hour. *Int. J. Adv. Res.*, vol. 5 (10), pp. 695–709.
11. CHEkhonin V. (2000) Osnovnoj belok mielina. Stroenie, svojstva, funkcii, rol' v diagnostike demieliniziruyushchih zaboлеvanij [Basic myelin protein. Structure, properties, functions, role in diagnostics of demyelinating diseases]. *Voprosy medicinskoj himii*, 6, pp. 549–563.
12. Hakimova G. (2016) Spektr farmakologicheskikh effektov antitel k belku S100 v reliz-aktivnoj forme i mekhanizmy ih realizacii [Spectrum of pharmacological effects of antibodies to protein S100 in release active form and mechanisms of their implementation]. *ZHurnal nevrologii i psihiatrii*, 4, pp. 100–113.
13. He Z., Bateman A. (2003) Progranulin (granulin-epithelinprecursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J. Mol. Med.*, vol. 81, pp. 600–612.
14. Van Damme P. (2008) Progranulin functions as a neutrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J. Cell Biol.*, vol. 181, pp. 37–41.
15. AL-Ayadhi L.Y., Mostafa G.A. (2011) Low plasma progranulin levels in children with autism. *J. Neuroinflam.*, vol. 8, pp. 111–120.
16. SHakova F. (2013) Zashchitnaya rol' antitel k glutamatu pri ochagovom ishemičeskom povrezhdenii prefrontal'noj kory mozga kryс [Protective role of glutamate antibodies in focal ischemic damage of prefrontal cortex of rat brain]. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya*, 3, pp. 19–22.
17. Gruden' M. (2017) Nejroprotektornye efekty antitel k glutamatu pri narusheniyah pamyati, inducirovannyh oligomerami provospalitel'nogo belka S100A9, u stareyushchih zhivotnyh [Neuroprotective effects of glutamate antibodies in memory impairment induced by oligomers of pro-inflammatory protein S100A9 in aging animals]. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya*, vol. 61, no 4, pp. 13–20.
18. Vetrile L. (2016) Vliyanie antitel k glutamatu pri intranasal'nom vvedenii na sodержanie vozbuzhdayushchih i tormoznyh aminokislот v gippokampe i gipotalamuse kryс pri kombinirovannom stressornom vozdejstvii [Influence of glutamate antibodies in intranasal administration on the content of excitatory and inhibitory amino acids in the hippocampus and hypothalamus of rats in combined stress exposure]. *Patol. endokrinol. i eksperim. terapiya*, 1, pp. 4–10.
19. Davydova T. (2018) Nejrobiologicheskaya predispolozhennost' k addiktivnym rasstrojstvam. Antitela k nejromediatoram [Neurobiological predisposition to addictive disorders. Antibodies to neurotransmitters]. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya*, vol. 62, no 4, pp. 254–256.
20. Frolov M. (2017) Rol' antitel k osnovnomu belku mielina v narushenii gidrodinamiki pri pervichnoj otkrytougol'noj glaukome [Role of antibodies to basic myelin protein in violation of hydrodynamics in primary open angle glaucoma]. *Vestnik oftal'mologii*, 3, pp. 37–43.
21. Libbey J.E. (2008) Are there enhanced MBP autoantibodies in autism? *J. Autism Dev. Disord.*, vol. 38, pp. 324–332.
22. Martens L.H. (2012) Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *J. Clin. Invest.*, vol. 122 (11), pp. 3955–3959.

Поступила/Received: 10.09.2019

Контакты/Contacts: mityukovat@gmail.com

Анализ частот генетических полиморфизмов спортсменов игровых видов спорта Республики Беларусь

Analysis of the Frequency of Genetic Polymorphisms of Sports Athletes in the Republic of Belarus

Резюме

Введение. В статье представлены результаты исследования частоты полиморфных вариантов генов у спортсменов высокой квалификации в Республике Беларусь.

Цель. Определить особенности частоты встречаемости генов ACE (rs4646994), ACTN3 (rs1815739), AMPD1 (rs17602729), PPARGC1A (rs8192678) у спортсменов высокой квалификации, специализирующихся в бадминтоне, большом и настольном теннисе.

Материалы и методы. В исследовании приняло участие 87 спортсменов (бадминтон, большой и настольный теннис) и 113 человек группы сравнения, не занимающихся профессиональной спортивной деятельностью.

Материалом для исследования послужили образцы буккального эпителия. Для определения аллельных вариантов генов использованы методы сайт-специфической ПЦР и ПЦР-ПДРФ. Детекция проходила с использованием метода электрофореза в полиакриламидном и агарозном гелях.

Результаты и обсуждение. Различия между группами наблюдались для частот генотипов I/D полиморфизма гена ACE и R577X полиморфизма гена ACTN3 ($p < 0,05$). Частота генотипов AMPD1 и PPARGC1A в исследуемых выборках не различалась ($p > 0,05$).

В исследовании наблюдались различия распределения генотипов по группам видов спорта. Так, генотипы DD ACE, TT AMPD1 и Gly/Ser PPARGC1A преобладали в группе спортсменов, специализирующихся в бадминтоне, для гена ACTN3 генотип XX выше у спортсменов настольного тенниса.

Заключение. Выявлены особенности генетических полиморфизмов генов, присущие организму спортсменов. Установлены достоверные различия частот генотипов гена ACE и ACTN3 у представителей разных спортивных групп.

Среди спортсменов, специализирующихся в бадминтоне, выявлены следующие сочетания генотипов: DD ACE, RX ACTN3, CT AMPD1, Glu/Ser PPARGC1A; у спортсменов, занимающихся теннисом, – ID ACE, RX ACTN3, Glu/Ser PPARGC1A, различия в большом и настольном теннисе наблюдались для полиморфизма гена AMPD1, в настольном теннисе – генотипа TT, в большом теннисе – CC.

Ключевые слова: генотип, аллель, полимеразная цепная реакция, генетический полиморфизм, инсерционно-делеционный полиморфизм, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Abstract

Introduction. The article presents the results of studies of the frequency of polymorphic variants of genes in highly qualified athletes in the Republic of Belarus.

Purpose. To determine the frequency of occurrence of genes ACE, ACTN3, AMPD1, PPARGC1A in highly qualified athletes (badminton, table tennis, and tennis).

Materials and methods. The study included 87 athletes (badminton, tennis, table tennis) and 113 people of the comparison group, who were not involved in professional sports.

The material of the study was the samples of buccal epithelium. The methods of site-specific PCR and PCR polymorphisms of lengths of restriction fragment were used. Detection of DNA sequences was carried out using the method of electrophoresis in polyacrylamide and agarose gels.

Results and discussion. Significant differences between the groups were registered for I/D polymorphism of the ACE and R577X polymorphism of the ACTN3 ($p < 0.05$). The frequency of AMPD1 and PPARGC1A did not differ in the studied selections ($p > 0.05$).

The differences in the groups of sports were registered in the study. The genotype DD ACE, TT of AMPD1 and Gly/Ser PPARGC1A was higher in the group of athletes that specialize in badminton; the genotype XX ACTN3 was higher in athletes of table tennis (20%).

Conclusion. There were identified the features of genetic polymorphisms of the genes inherent in athletes. Significant differences were found between the frequencies of genotypes of the genes ACE and ACTN3 in different sports groups.

The athletes that specialize in badminton have the combination of the following genotypes: DD ACE, RX ACTN3, CT AMPD1, Glu/Ser PPARGC1A; athletes of tennis: ID ACE, RX ACTN3, Glu/Ser PPARGC1A. The differences in tennis and table tennis were observed only for AMPD1; in table tennis it was TT, in tennis it was CC.

Keywords: genotype, allele, polymerase chain reaction, genetic polymorphism, insertion-deletion polymorphism, polymorphism of the lengths of restriction fragments.

■ ВВЕДЕНИЕ

Индивидуальные физические особенности человека зависят от комбинации разнообразных и многочисленных внешних и генетических факторов. Специфика тренировочного процесса в рамках различных спортивных дисциплин требует развития определенных физических качеств. Одиночные игровые виды спорта способствуют укреплению сердечно-сосудистой и дыхательной системы, развитию быстроты реакции, ловкости, выносливости, эмоциональной устойчивости, укреплению мышц тела [1]. Тщательно спланированная тренировка и другие внешние факторы, являющиеся решающими для становления высококвалифицированного спортсмена, не могут обусловить индивидуальные пороги физической работоспособности, поскольку они в значительной степени определяются генетической конституцией, а тренировка может быть обозначена как процесс, через который этот потенциал реализуется [2–5].

Де Мур и соавт. (2007) предположили, что спортивный статус генетически детерминирован на 66%, а оставшиеся 44% составляют такие факторы, как тренировка, питание, мотивация, образ жизни и прогресс в оборудовании и применяемых методиках и т. д. [6]. В группу генетических компонентов включены генные варианты, характеризующие такие

показатели, как выносливость, скорость, сила, размер мышечного волокна и его состав, гибкость, нервно-мышечная координация, темперамент и др.

В конце 50-х – начале 60-х гг. XX в. появились первые работы по анализу родословных, позволившие судить о наличии генетической составляющей становления конституции спортсменов. Однако только в 90-е гг. XX в. благодаря использованию новых высокотехнологичных методов молекулярной биологии появилась возможность определения механизмов наследственности физических и психических качеств человека [7].

Методы молекулярной генетики в спорте впервые были применены К. Бушаром и Х. Монтгомери. В 1995 г. К. Бушар инициировал выполнение международного проекта HERITAGE (сокр. от Health, Risk Factor, Exercise Training and Genetic), в рамках которого определялась связь генотипа и его фенотипических проявлений у людей, не имеющих профессиональных спортивных навыков, под влиянием физической нагрузки различной направленности [8].

Монтгомери и соавт. (1998) впервые опубликовали данные о статистически значимой взаимосвязи полиморфизма гена и его влиянии на физические качества человека. Примером этому послужил инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (ACE) и его влияние на способность альпинистов к высокогорному восхождению [9, 10]. В тот же период времени другая группа исследователей из Австралии выявила ассоциацию гена ACE с предрасположенностью к занятиям академической греблей [11]. С тех пор эра спортивной генетики начала набирать обороты, и на сегодняшний день уже известно более 240 генов, полиморфизмы которых ассоциированы с реализацией физических возможностей [12].

Все более ясным становится то, что использование методов генетического тестирования дает возможность совершенствования методик отбора спортсменов в конкретные виды спорта, оценки особенностей и темпов адаптации к физическим нагрузкам. Разработка модельных характеристик по видам спорта не может способствовать учету всей специфики организма каждого спортсмена, его наследственных задатков, которые реализуются в процессе тренировки [13]. Эта проблема во многом и определяет неточность производимых спортивных прогнозов и является актуальной.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить особенности частоты встречаемости генов ACE (rs4646994), ACTN3 (rs1815739), AMPD1 (rs17602729), PPARGC1A (rs8192678) у спортсменов высокой квалификации, специализирующихся в бадминтоне, большом и настольном теннисе.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняло участие 87 спортсменов, специализирующихся в одиночных игровых видах спорта (бадминтон, большой и настольный теннис), средний возраст которых составил $22,5 \pm 3,1$ года. В зависимости от уровня спортивной квалификации группа спортсменов включала кандидатов в мастера спорта (КМС, $n=22$), мастеров

Таблица 1
Последовательности праймеров

Ген	Полиморфизм	Нуклеотидная последовательность
ACE	I/D (rs4646994)	[F] – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' [R] – 5'-GATGTGCCATCACATTCGTACAGAT-3'
ACTN3	R577X (rs1815739)	[F] – 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG-3' [R] – 5'-TGGTCACAGTATGCAGGAGGG-3'
AMPD1	Gln12Ter (rs17602729)	[F] – 5'-CTTCATACAGCTGAAGAGACA-3' [R] – 5'-GAATCCAGAAAAGCCATGAGC-3'
PPARGC1A	Gly482Ser (rs8192678)	[F] – 5'-GAGCCGAGCTGAACAAGCAC-3' [R] – 5'-GGAGACACATTGAACAATGAATAGGATTG-3'

спорта (МС, n=36), мастеров спорта международного класса (МСМК, n=26), заслуженных мастеров спорта (ЗМС, n=3). Группу сравнения составили 113 человек, не занимающихся профессиональной спортивной деятельностью (средний возраст 20,7±3,25 года).

Материалом для исследования послужили образцы буккального эпителия, собранные с соблюдением процедуры информированного согласия.

В работе использованы методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) на основе стандартных компонентов (ПЦР-буфер, MgCl₂, dNTP, Taq-полимераза, H₂O) и праймеров, подобранных в соответствии с последовательностью ДНК, с помощью сайта <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Для определения аллельных вариантов исследуемых генов использованы методы сайт-специфической ПЦР и ПЦР полиморфизмов длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В табл. 1 приведены праймеры для анализа исследуемых полиморфизмов генов.

Детекция амплифицированных ДНК последовательностей генов осуществлялась с использованием метода электрофореза в полиакриламидном (для полиморфизмов длин стрикционных фрагментов) и агарозном (для инсерционно-делеционного фрагмента) гелях.

Интерпретация полученных результатов

Гомозигота аллеля инсерции «I» инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента (ACE I/D) определялась по наличию на электрофореграмме фрагмента длиной 479 п.н., в то время фрагмент делеции «D» находится на уровне 192 п.н. При этом наличие обоих фрагментов определялось как гетерозиготный генотип «I/D» гена ACE (рис. 1).

При детекции амплифицированного участка полиморфизма R577X гена ACTN3 образуются фрагменты ДНК различной длины: а) генотипу R/R соответствуют два фрагмента длиной 205 и 85 п.н.; б) генотипу R/X – четыре фрагмента длиной 205, 108, 97 и 85 п.н.; в) генотипу X/X – три фрагмента длиной 108, 97 и 85 п.н. Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 2.

При детекции амплифицированного участка полиморфизма C12T гена AMPD1 возможно образование фрагментов ДНК различной длины: а) генотипу CC соответствует фрагмент длиной 214 п.н., б) генотипу TT –

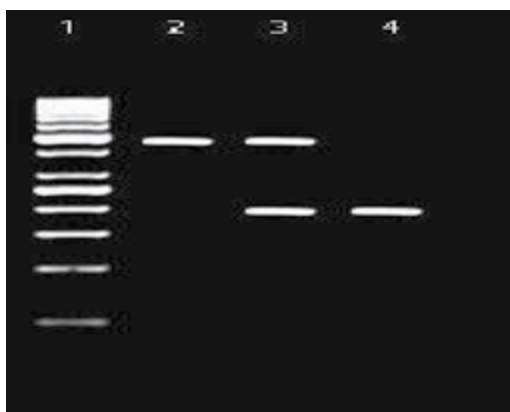


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена ACE: 1 – ladder; 2 – гомозигота инсерции (I/I генотип); 3 – гетерозигота (генотип I/D); 4 – гомозигота делеции (генотип D/D)

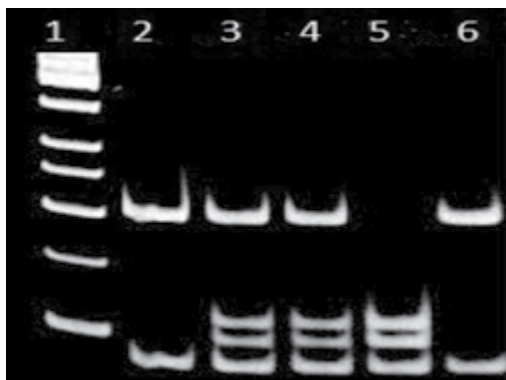


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена ACTN3: 1 – ladder; 2, 6 – гомозигота RR; 3, 4 – гетерозигота RX; 5 – гомозигота XX

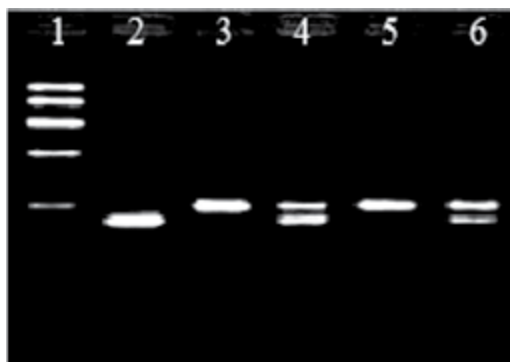


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации гена AMPD1: 1 – ladder; 2 – гомозигота ТТ; 3, 5 – гомозигота СС; 4, 6 – гетерозигота СТ

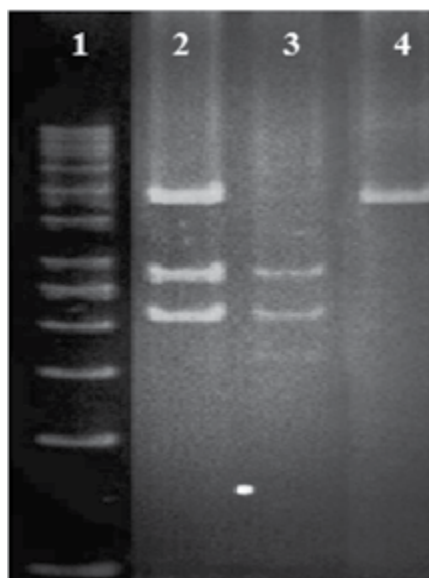


Рис. 4. Электрофорез продуктов амплификации гена PPARGC1A: 1 – ladder, 2 – генотип Ser/Gly, 3 – генотип Gly/Gly, 4 – генотип Ser/Ser

фрагмент длиной 191 п.н. в) генотипу СТ – два фрагмента длиной 214 и 191 п.н. Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 3.

При детекции амплифицированного участка полиморфизма Gly482Ser гена PPARGC1A образуются фрагменты ДНК различной длины: а) генотипу Ser/Ser соответствуют нерестрицированный фрагмент длиной 260 п.н.; б) генотипу Ser/Gly – три фрагмента длиной 260, 148 и 112 п.н.; в) генотипу Gly/Gly – 2 фрагмента длиной 148 и 112 п.н. Интерпретация результатов проводится в соответствии с рис. 4.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 7.0 и Microsoft Office Excel 2013.

Применялись методы оценки нормальности распределения и достоверности различий исследуемых выборок. Значимость различий частот встречаемости качественных признаков между сравниваемыми выборками устанавливали с помощью критерия χ^2 с учетом поправки Йетса и точного критерия Фишера ϕ . Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования были отобраны функционально значимые полиморфизмы 4 генов, белковые продукты которых регулируют некоторые процессы в организме, а именно: в качестве полиморфных маркеров, влияющих на формирование скоростно-силовых качеств, выбран ген альфа-актина-3 ACTN3 (R/X); отвечающий за работу сердечно-сосудистой системы – инсерционно-делеционный полиморфизм ACE (I/D); вовлеченный в регуляцию углеводного и липидного обмена – PPARGC1A

(G/A); обеспечивающий регуляцию энергетического метаболизма скелетной мускулатуры во время физических нагрузок – AMPD (C/T). Результаты генотипирования представлены в табл. 2.

Статистически достоверные различия между анализируемыми группами наблюдались для распределения частот генотипов инсерционно-делеционного полиморфизма гена ACE ($p < 0,05$). Наблюдаемое распределение генотипов полиморфизма I/D гена ACE основной группы составило II=3,4%, ID=46,0%, DD=50,6%, группы сравнения – II=17,7%, ID=39,8%, DD=42,5%. Статистически достоверные различия между анализируемыми группами наблюдались для распределения частот генотипов R577X полиморфизма гена ACTN3 ($p < 0,05$). Распределение генотипов гена ACTN3 группы спортсменов составило: RR=21,0%, RX=72,8%, XX=6,2%, а группы сравнения – RR=31,9%, RX=48,7%, XX=19,4%.

Распределение генотипов в изучаемых группах позволяет рассчитать коэффициент соотношения шансов для полиморфизмов генов ACE и ACTN3. Среди спортсменов высокого класса наличие DD-генотипа гена ACE в 1,20 раза выше, а XX-генотип гена ACTN3 в 3,1 раза реже по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$).

Частота генотипов гена AMPD1 и PPARGC1A не различалась в исследуемых выборках ($p > 0,05$).

Таблица 2
Распределение генотипов полиморфизмов генов, ассоциированных с предрасположенностью к занятиям спортом

Полиморфизм	Генотип/аллели	Группа спортсменов	Группа сравнения
		%	%
ACE (I/D)	II	3,4*	17,7*
	ID	46,0*	39,8*
	DD	50,6*	42,5*
	I	26,3	37,6
	D	73,7	62,4
ACTN3 (R/X)	RR	21,0*	31,9*
	RX	72,8*	48,7*
	XX	6,2*	19,4*
	R	56,9	56,2
	X	43,1	43,8
AMPD (C/T)	CC	27,0	11,5
	CT	39,7	56,6
	TT	33,3	31,9
	C	46,6	44,7
	T	53,4	55,3
PPARGC1A (PGC1A) (G/A)	GLY/GLY	27,3	35,4
	GLY/SER	63,6	52,2
	SER/SER	9,1	12,4
	GLY	59,2	61,5
	SER	40,8	38,5

Примечание: * различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Таблица 3
Распределение генотипов полиморфизмов генов, ассоциированных с физическими способностями спортсменов, по группам видов спорта

Вид спорта	Единицы измерения	Ген/ генотипы			F	p
ACE						
		DD	ID	II	F	p
Бадминтон	%	84,6	15,4	0,0	18,777	p<0,05
Большой теннис	%	34,1	59,1	6,8		
Настольный теннис	%	35,3	64,7	0,0		
ACTN3						
		RR	RX	XX	F	p
Бадминтон	%	14,8%	85,2%	0,0%	10,462	p<0,05
Большой теннис	%	25%	72,5%	2,5%		
Настольный теннис	%	30%	50,0%	20%		
AMPD1						
		CC	CT	TT	F	p
Бадминтон	%	40,7	55,6	3,7	23,837	p<0,05
Большой теннис	%	43,9	22,0	34,1		
Настольный теннис	%	21,1	26,3	52,6		
PPARGC1A						
		GLY/GLY	GLY/SER	SER/SER	F	p
Бадминтон	%	0,0%	85,7%	14,3	17,938	p<0,05
Большой теннис	%	40,0	52,5	7,5		
Настольный теннис	%	42,1	47,4	10,5		

В выполненном исследовании был проведен анализ распределения генотипов изучаемых генов внутри групп спортсменов в зависимости от вида спорта. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Частота всех полиморфизмов генов значимо различалась в группах спортсменов по видам спорта. Так, частота ACE DD-генотипа в группе бадминтона составила 85% против 34% и 35% в группах спортсменов большого и настольного тенниса. Для гена ACTN3 частота генотипа XX превалировала в группе спортсменов, специализирующихся в настольном теннисе, и составила 20% против 0% и 2,5% в группах спортсменов бадминтона и большого тенниса. Частота AMPD1 TT-генотипа в группе настольного тенниса составила 53% против 4% и 34% – в группах спортсменов бадминтона и большого тенниса. Частота генотипа Gly/Ser гена PPARGC1A составила 86%, 53% и 47% (бадминтон, большой и настольный теннис соответственно).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для подготовки спортсменов высокого класса необходима разработка новых критериев оценки функциональных особенностей и методов диагностики спортивной перспективности.

Поскольку на сегодняшний день в процессе спортивного отбора тренеры и специалисты руководствуются только уровнем текущей

подготовки, актуальной проблемой остается изучение факторов, ограничивающих работоспособность спортсменов. Так, наиболее важными неучтенными факторами, лимитирующими время, потраченное на подготовку спортсмена высокого класса, продолжительность и интенсивность его физических нагрузок, время восстановления и, как следствие, спортивную результативность, являются генетические различия индивидов.

В проведенном исследовании изучались генетические особенности спортсменов игровых видов спорта (бадминтон, большой и настольный теннис). Выявлены достоверные различия распределения частот генотипов гена ACE и ACTN3 среди исследуемых групп.

Среди представителей игровых видов спорта (бадминтон, большой и настольный теннис) установлено преобладание генотипа DD гена ACE в 1,2 раза по сравнению с группой лиц, не занимающихся активно спортивной деятельностью ($p < 0,05$); это подтверждают имеющиеся в литературе данные о большом вкладе данной полиморфной генетической системы в реализацию скоростно-силовых качеств. Выявлено то, что среди спортсменов-игровиков достоверно реже (в 3,1 раза) встречаются носители генотипа XX полиморфизма R577X гена ACTN3 относительно лиц группы сравнения ($p < 0,05$).

По результатам выполненных исследований большинство спортсменов, специализирующихся в бадминтоне, имеют следующее сочетание генотипов исследуемых генов: DD ACE, RX ACTN3, CT AMPD1, Glu/Ser PPARGC1A. Для спортсменов, занимающихся теннисом, наблюдалось следующее сочетание генотипов: ID ACE, RX ACTN3, Glu/Ser PPARGC1A. Различия в большом и настольном теннисе наблюдались только для полиморфизма гена AMPD1: так, в настольном теннисе наиболее часто встречающимся генотипом был TT, в то время как в большом – CC.

Полученные данные дают основание считать однонуклеотидные полиморфизмы Alu I/D ACE (аллель D) и R577X ACTN3 (R-аллель) возможными прогностическими маркерами достижения высоких результатов в игровых видах спорта.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Furmanov A.G. (2012) *Fizicheskaya reakciya: uchebnyk dlya studentov vuzov. Monografiya* [Physical reaction: textbook for university students. Monograph]. Minsk: MET, 495 p. (in Russian)
2. Axmetov I. (2008) *Ispol'zovanie molekulyarno-geneticheskix metodov dlya prognoza ae`robny`x i anae`robny`x vozmozhnostej u sportsmenov* [Use of molecular-genetic methods for prediction of aerobic and anaerobic capabilities in athletes]. *Fiziologiya cheloveka*, vol. 34, no 3, pp. 86–91.
3. Glotov O.S. (2009) *Sostoyanie i perspektivy` geneticheskogo testirovaniya v sporte. Geneticheskij pasport sportsmena stanovitsya real`ny`m* [State and prospects of genetic testing in sport. Genetic passport of athlete becomes real]. *Molekulyarno-biologicheskie texnologii v medicinskoj praktike: sb. st.* [Molecular-biological technologies in medical practice: collection of articles]. Novosibirsk: Al`ta Vista, vol. 13, pp. 17–35.

4. Egorov V.M. (2010) Ocenka uzkoj specializacii i individualizacii trenirovochnogo processa u vy`sokokvalificirovanny`x sportsmenov na osnove geneticheskix programm [Assessment of narrow specialization and individualization of training process in highly qualified athletes on the base of genetic programs]. *Kliniko-laboratorny`j konsilium*, no 2–3, pp. 179.
5. Kamy`shnikov V. (2019) *Laboratorny`e issledovaniya v sportivnoj medicine: uchebno-metodicheskoe posobie* [Laboratory studies in sports medicine: teaching aid]. Minsk: BelMAPO, 117 p. (in Russian)
6. De Moor M.H., Spector T.D., Cherkas L.F., Falchi M., Hottenga J.J., Boomsma D.I., De Geus E.J. (2007) Genome-wide linkage scan for athlete status in 700 British female DZ twin pairs. *Twin Res. Hum. Genet.*, vol. 10 (6), pp. 812–820.
7. Rogozkin V.A. (2006) Perspektivy` ispol`zovaniya DNK-texnologij v sporte [Prospects of use of DNA-technologies in sport]. *Teoriya i praktika fizicheskoj kul`tury`*, no 7, pp. 45–47.
8. Bray M.S. (2009) The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes: The 2006-2007 Update. *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 41, pp. 35–73.
9. Montgomery H.E., Clarkson P., Dollery C.M., Prasad K., Losi M.A., Hemingway H., Statters D., Jubb M., Girvain M., Varnava A., World M., Deanfield J., Talmud P., McEwan J.R., McKenna W.J., Humphries S. (1997) Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation*, vol. 96, pp. 741–747.
10. Montgomery H.E. (1998) Human gene for physical performance. *Nature*, no 393, pp. 221–222.
11. Gayagay G., Yu B., Hambly B., Boston T., Hahn A., Celermajer D.S., Trent R.J. Elite endurance athletes and the ACE I allele – the role of genes in athletic performance. *Hum. Genet.*, vol. 103, pp. 48–50.
12. Axmetov I. (2009) *Molekulyarnaya genetika sporta. Monografiya* [Molecular genetics of sport. Monograph]. M.: Sovetskij sport, 268 p. (in Russian)
13. Verxoshanskij Yu. (1993) Aktual`ny`e problemy` sovremennoj teorii i metodiki sportivnoj trenirovki [Actual problems of modern theory and methodology of sports training]. *Teoriya i praktika fizicheskoj kul`tury`*, no 8, pp. 21–28.

Поступила/Received: 05.09.2019

Контакты/Contacts: liudmila.sosna92@gmail.com

Зайцева В.Н.¹, Рогачева Т.А.^{1,2}, Анисько Л.А.^{1,2}, Соловей Н.В.²

¹ Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Zaitseva V.¹, Rogacheva T.^{1,2}, Anisko L.^{1,2}, Solovej N.²

¹ City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Грибковые (криптококковые) поражения центральной нервной системы у ВИЧ-позитивных пациентов: методы ранней диагностики и определения чувствительности к противогрибковым препаратам

Fungal (Cryptococcal) Lesions of the Central Nervous System in HIV-Positive Patients: Methods of Early Diagnostics and Determination of Sensitivity to Antifungal Drugs

Резюме

Введение. Инвазивные грибковые микозы у ВИЧ-инфицированных пациентов характеризуются тяжелым течением, часто сопровождаются поражением центральной нервной системы и высокой летальностью. Диагностика инвазивных микозов при иммунодефицитных состояниях нередко затруднена. Серологические методы диагностики разработаны лишь для немногих микозов. В статье представлены результаты диагностики криптококковых поражений нервной системы с использованием серологических и молекулярно-биологических методов исследования в учреждении здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» Минска.

Цель. Определение чувствительности к противогрибковым препаратам клинических изолятов *Cryptococcus neoformans*, выделенных от пациентов, госпитализированных в учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» в 2014–2018 гг.

Материалы и методы. В исследование были включены 9811 образцов клинически значимого биологического материала (цереброспинальная жидкость, цельная кровь, сыворотка крови и плазма), полученных от ВИЧ-позитивных пациентов, госпитализированных в учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» в 2014–2018 гг.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что наиболее высокий уровень фунгицидной активности проявляют флуконазол, вориконазол, а также амфотерицин В.

Выводы. Методы серологической (латекс-тест) и молекулярно-биологической (ПЦР) диагностики позволяют верифицировать криптококковое поражение нервной системы у иммунокомпromетированных пациентов на ранней стадии заболевания, а также могут успешно использоваться для контроля за эффективностью проводимой терапии. Однако для определения чувствительности к фунгицидным препаратам целесообразно использовать культуральный метод.

Ключевые слова: оппортунистические инвазивные микозы, *Cryptococcus neoformans*, ВИЧ-инфекция, криптококковый менингоэнцефалит, диагностика, микробиология.

Abstract

Introduction. Invasive fungal mycoses in HIV-infected patients are characterized by severe course, often accompanied by damage to the central nervous system and high mortality. The article presents diagnostic results of the CNS *Cryptococcus* lesions using serological and molecular biological research methods at the laboratory of Minsk hospital of infectious diseases.

Purpose. To assess the sensitivity to antifungal drugs of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients hospitalized at the Minsk clinical hospital of infectious diseases in 2014–2018.

Materials and methods. The study included 9811 clinical samples (CSF, blood, serum and plasma) from HIV-positive patients hospitalized at the Minsk clinical hospital of infectious diseases in 2014–2018.

Results and discussion. The results of the study demonstrate that the highest level of fungicidal activity was observed in fluconazole, voriconazole, and amphotericin B.

Conclusions. Serological (latex test) and molecular biological (PCR) diagnostic methods let to verify cryptococcal lesions of the nervous system in immunocompromised patients, and can be successfully used to control the quality of treatment. However, to determine the sensitivity to fungicidal drugs, it is necessary to use the culture method.

Keywords: opportunistic invasive mycoses, *Cryptococcus neoformans*, HIV-infection, cryptococcal meningoencephalitis, diagnostics, microbiology.

■ ВВЕДЕНИЕ

Наблюдаемый в течение последних нескольких десятилетий ежегодный рост встречаемости оппортунистических инвазивных микозов стал значительной проблемой для здравоохранения [1–3]. Применение новых медицинских технологий (трансплантация органов и стволовых клеток), широкое использование цитостатиков, кортикостероидов, иммуносупрессантов, антибиотиков широкого спектра действия, инвазивных диагностических и лечебных процедур, рост числа ВИЧ-инфицированных – неполный круг причин, способствующих формированию популяции людей с повышенной восприимчивостью к грибковым болезням [4, 5].

С конца 80-х гг. XX столетия и по настоящее время наблюдается рост случаев криптококкоза у ВИЧ-позитивных пациентов [6]. В мире ежегодно регистрируется около 1 млн больных, из них умирает 680 000. Распространенность заболевания составляет от 0,3 до 0,5 на 100 000 населения [6, 7]. На долю больных криптококкозом приходится от 3 до 8% пациентов с ВИЧ-инфекцией в странах Европы и Америки [8], в странах Африки и Юго-Восточной Азии до 30% [9]. Летальность зависит от уровня экономического развития страны и варьирует от 3–5% в странах Европы и США до 80% в странах Африки [10].

В настоящее время это заболевание входит в число трех наиболее опасных для жизни оппортунистических инфекций у пациентов с продвинутой стадией ВИЧ-инфекции и является одной из ведущих причин смерти пациентов [11]. Без лечения от криптококкового менингоэнцефалита умирает 100% пациентов [11–13].

Показано, что среди известных в настоящее время 100 видов базидиомицетовых грибов медицинское значение имеет комплекс *Cr. neoformans* / *Cr. gatii* [14]. *Cr. gatii* наибольшее распространение получил в странах с тропическим климатом, на территории Европы и России доминирует *Cr. neoformans*.

К факторам патогенности криптококков относят их способность расти при температуре 37 °С, к капсулообразованию, меланинообразованию, фосфолипазной и уреазной активностям. Наличие полисахаридной капсулы и способность вырабатывать меланин препятствуют фагоцитозу. Фосфолипаза разрушает клеточные мембраны человека, уреазы способствует адгезии дрожжей к эндотелиальным клеткам, не иницируя воспалительного ответа [6, 15]. Криптококки имеют соматические и капсульные антигены. Установлено, что капсульные полисахариды криптококков тормозят выработку антител, способствуя тем самым выживанию и размножению патогенных криптококков в организме [16].

Диагностика грибковых инфекций нередко является сложной. Клинические признаки заболевания часто неспецифичны, особенно у иммунокомпрометированных пациентов, что требует обязательного использования лабораторных методов диагностики для подтверждения той или иной инфекции. В настоящее время серологические и молекулярно-генетические методы диагностики грибковых поражений нервной системы разработаны лишь для немногих микозов, в том числе для криптококкоза.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение микологического обследования пациентов с ВИЧ-инфекцией с клиническими признаками поражения центральной нервной системы и определение чувствительности к противогрибковым средствам культурально выделенных возбудителей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены образцы клинически значимого биологического материала (цереброспинальная жидкость, кровь, сыворотка крови и плазма), полученные от ВИЧ-позитивных пациентов, госпитализированных в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» в 2014–2018 гг. Использовались культуральный, серологический и молекулярно-генетический (ПЦР в режиме реального времени) методы исследования.

Исследование на стерильность крови и ЦСЖ проводили с помощью автоматического анализатора гемокультур *Bact/ALERT* фирмы *BioMérieux* (Франция). Для посева биоматериала использовали флаконы *Bact/ALERT FN*, *Bact/ALERT FA*, *Bact/ALERT PF* с активированным углем, предназначенные для качественного выделения аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) в крови и других в норме стерильных биологических жидкостях.

Микробиологический посев крови и ЦСЖ проводили у постели пациента с соблюдением всех правил асептики, по возможности – до начала антимикробной терапии.

Посев, культивирование и выделение чистой культуры возбудителей выполняли общепринятыми методами, согласно методическим рекомендациям «Микробиологические методы исследования биологического материала» № 075-0210 от 19.03.2010 г.

Идентификация видовой принадлежности выделенных микроорганизмов выполнялась на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция) с помощью идентификационных карт YST (идентификация патогенных дрожжевых грибов). Определение активности наиболее часто применяемых антифунгальных препаратов проводили общепринятым методом определения MIC на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы BioMerieux (Франция) с использованием карт AST-YS07. Приготовление суспензии до оптической плотности 0,5 по МакФарланду, соответствующей $1,5 \times 10^8$ микробных клеток/мл, осуществляли при помощи автоматического дозатора и диспенсера жидкости. Стандартизацию инокулюма выполняли, используя калиброванный автоматический денситометр Vitek 2 DensiCHEK.

При описании результатов чувствительности микроорганизмов к антимикотикам использовались категории «чувствительные», «умеренно-резистентные» и «резистентные» изоляты.

Материалом для иммунологических исследований (выполнялись в период с августа 2016 г. по ноябрь 2018 г.) на наличие криптококкового антигена методом латекс-агглютинации явились пробы ЦСЖ, сыворотки крови и плазмы. Использовались тест-системы Pastorex Cryptoplus производства фирмы (BioRad, Франция).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлены результаты бактериологического исследования на стерильность клинического материала (крови и ЦСЖ) пациентов, находившихся на лечении в инфекционном стационаре УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» Минска за 2014–2018 гг. Всего на стерильность было исследовано 9811 проб, в том числе 1006 образцов ЦСЖ и 8805 образцов крови.

Культуральное исследование поступивших в лабораторию проб ликвора и крови проводили на выявление бактериального и грибкового роста. В ходе исследования образцов биологического материала в 20 пробах ЦСЖ и 7 пробах крови были выделены культуры дрожжеподобных грибов от 16 пациентов (см. рисунок).

Микробный пейзаж выделенных в чистом виде культур дрожжеподобных грибов, идентифицированный на бактериологическом анализаторе с вероятностью 99%, был представлен одним микроорганизмом – *Cryptococcus neoformans*.

Изолированные культуры грибов тестировали на чувствительность к антимикотическим препаратам. Результаты изучения чувствительности к антифунгальным средствам *Cr. neoformans* представлены в табл. 1. Анализ данных показал, что выделенные изоляты *Cr. neoformans* обладали высокой чувствительностью (в 100% случаев) к противогрибковым препаратам группы азолов (флюконазолу и вориконазолу), в то время как чувствительность к представителю полиенового ряда (амфотерицину В) составила 88,9%, а 11,1% изолятов *Cr. neoformans* были умеренно резистентны к данному препарату. Полученные результаты согласуются



Количество положительных образцов ЦСЖ и крови при исследовании на стерильность, из которых за период с 2014 по 2018 г. в бактериологической лаборатории УЗ «ГКИБ» Минска выделены изоляты *Cr. neoformans*

с данными литературы, в соответствии с которыми показано, что первичная резистентность *Cr. neoformans* к азоловым антимикотикам развивается редко [17, 18], однако при длительной антифунгальной терапии возможно развитие вторичной резистентности.

Согласно полученным данным, можно заключить, что применяемый для лечения криптококкоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией фунгицидный препарат полиенового ряда (амфотерицин В) должен обязательно сочетаться с антимикотическими средствами имидазолового ряда (флюконазолом) либо флуцитозином (в настоящее время не зарегистрирован в Республике Беларусь).

Таблица 1
Чувствительность к антифунгальным препаратам изолятов *Cr. neoformans*, выделенных из образцов крови и ликвора в инфекционном стационаре УЗ «ГКИБ» Минска за период с 2014 по 2018 г.

Исследуемый антибиотик	Количество изолятов	%R	%I	%S
Амфотерицин В	9	0	11,1	88,9
Флюконазол	8	0	0	100
Вориконазол	4	0	0	100

Таблица 2
Результаты исследования ЦСЖ и сыворотки крови на наличие антигена *C. neoformans* методом латексной агглютинации

Год	Исследовано всего образцов / получен положительный результат						
	ЦСЖ	Из них +	Кровь	Из них +	Всего проб	Из них всего +	Положит. лиц
2016	26	6	8	2	35 (1-пл. ж)	8	6
2017	89	10	15	3	104	13	7
2018	105	9	32	3	137	12	4
Всего	220	25	55	8	276	33	17

В целях экспресс-диагностики на наличие антигена *C. neoformans* методом латексной агглютинации было исследовано 276 образцов биологического материала от пациентов с ВИЧ-инфекцией (220 проб ЦСЖ и 55 проб сыворотки крови) (табл. 2).

Положительный результат был получен в 33 пробах – 12% от количества исследуемых образцов. Антиген криптококка выявлен в 11,4% ЦСЖ (25 проб) и 14,5% случаев в сыворотке крови (8 проб).

Следует отметить, что у 17 пациентов антиген *C. neoformans* методом латексной агглютинации выявлялся одновременно в пробах ликвора и сыворотки крови как однократно, так и в динамике, качественно и в титрах. Так, например, у пациента П. в 2018 г. с января по сентябрь была исследована ЦСЖ методом латексной агглютинации 8 раз. Первый позитивный результат на наличие антигена *C. neoformans* был получен 5 января и выполнен как качественный тест. Дальнейшие пробы исследовались в разведениях. Максимальный титр антигена 1:200 был выявлен в пробе ЦСЖ от 25 января. Последующие пробы ЦСЖ (от 30.01, 05.02 и 14.02) исследовались на фоне лечения антимикотическими препаратами. Титр антигена в данных образцах составил 1:100. Образцы ЦСЖ, полученные 22.02 и 07.03, содержали антиген *C. neoformans* в титре 1:50. При повторном (в сентябре) поступлении пациента П. в стационар для продолжения лечения ВИЧ-инфекции при исследовании проб ЦСЖ и сыворотки крови методом латексной агглютинации антиген *C. neoformans* не выявлялся.

Согласно данным литературы, показатели чувствительности и специфичности стандартных серологических тестов на антиген *Cryptococcus spp.* превышают 90%. Ложноположительные результаты встречаются редко, лишь при злокачественных новообразованиях и ревматических заболеваниях. Ложноотрицательные результаты обусловлены малым количеством антигена и свойствами возбудителя (отсутствием капсулы). Это означает, что обнаружение антигена *Cryptococcus spp.* в ЦСЖ и сыворотке крови пациентов с ВИЧ-инфекцией дает 90% подтверждение диагноза криптококкоза [19].

Высокую диагностическую значимость имеет обнаружение ДНК криптококка методом ПЦР в СМЖ и других биологических жидкостях. Выявление специфического фрагмента ДНК *C. neoformans* позволяет при однократном тестировании подтвердить клинический диагноз криптококкоза. Для оценки эффективности проводимой этиотропной терапии метод ПЦР позволяет оценивать концентрацию ДНК возбудителя в биологическом материале. Так, ПЦР-исследование криптококкоза было внедрено в лабораторную практику инфекционной больницы Минска в 2018 г. С этой целью использовался набор реагентов для выявления ДНК *Cryptococcus neoformans* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «АмплиСенс *Cryptococcus neoformans*-FL», формат FRT, производства ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (Российская Федерация). С августа 2018 г. по июль 2019 г. проведено 219 исследований СМЖ и плазмы крови на наличие ДНК криптококка, получено 5 положительных результатов у пациентов с ВИЧ-инфекцией в 4-й клинической стадии. У трех пациентов ДНК *C. neoformans* была выявлена в ЦСЖ, у одного в плазме крови и ЦСЖ.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы серологической (латекс-тест) и молекулярно-биологической (ПЦР) диагностики обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяют рано верифицировать криптококковое поражение нервной системы у иммунокомпрометированных пациентов, а также могут успешно использоваться для контроля за качеством проводимой терапии. Не менее важным для клинической практики остается и культуральное выделение криптококков из крови и ЦСЖ, позволяющее не только верифицировать диагноз, но и определить чувствительность патогена к противогрибковым лекарственным средствам.

Проведенное исследование показало высокий уровень фунгицидной активности флуконазола и вориконазола, а также амфотерицина В в отношении изолятов грибов *Cryptococcus neoformans*, что предполагает их использование в виде комбинации для терапии криптококковых поражений нервной системы у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Karaev Z. (2007) Nozokomial'nye mikozy: sostoyanie i perspektivy resheniya problemy [Nosocomial mycoses: state and prospects of solution of the problem]. *ZHurnal problemy medicinskoj mikologii*, vol. 9, no 3, pp. 21–23.
2. Karaev Z. (2013) Nozokomial'nye mikozy: sostoyanie i perspektivy resheniya problemy [Nosocomial mycoses: state and prospects of solution of the problem]. *ZHurnal problemy medicinskoj mikologii*, vol. 15, no 4, pp. 10–19.
3. Brown G., Denning D., Gow N. (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, vol. 4, p. 165.
4. Pokrovskij V. (2016) Infekciya, vyzyvayemaya virusom immunodeficyta cheloveka v Rossii [Infection caused by human immunodeficiency virus]. *Ter. arhiv*, 88 (11), pp. 4–11.
5. Fridkin S.K. (2005) The changing face of fungal infections in health care settings. *Clinical Infection Diseases*, vol. 41, p. 1455.
6. Vasil'eva N. (2005) *Faktory patogennosti Cryptococcus neoformans i ih rol' v patogeneze kriptokokkoza* [Factors of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* and their role in pathogenesis of cryptococcosis] (PhD Thesis), SPb., 340 p.
7. Bianic T., Boehhout T., Del Poeta M. (2008) Special report on 7 International Conference on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*. *Mycology newsletter*, pp. 10–24.
8. Elinov N., Bosak I. (2006) Proshloe i nastoyashchee *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) kak ob"ekta izucheniya potencial'no groznogo patogena dlya cheloveka [Past and present of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) as an object of study of potential serious pathogen for human]. *Problemy medicinskoj mikologii*, vol. 8, no 2, pp. 47–51.
9. Idnurm A., Bahn Y., Nielsen K. (2005) Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol.*, vol. 3, no 10, pp. 753–764.
10. Park B., Wannemuehler K., Marston B. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, vol. 23, pp. 525–530.
11. Rahmanova A., Lobzin YU. (2004) Udel'nyj ves mikofov v strukture vtorignyh zabozevanij u bol'nyh VICH/SPIIDom [The proportion of mycoses in the structure of secondary diseases in patients with HIV/AIDS]. *Problemy medicinskoj mikologii*, vol. 6, no 1, pp. 9–12.

12. Vasil'eva N. (2002) Kriptokokki i kriptokokkoz na sovremennom etape [Cryptococci and cryptococcosis at the modern stage]. *Problemy medicinskoj mikologii*, vol. 4, no 2, pp. 45–46.
13. Lesovoj V., Lipnickij A. (2008) Mikozy central'noj nervnoj sistemy (Obzor) [Mycoses of the central nervous system (review)]. *Problemy medicinskoj mikologii*, vol. 10, no 1, pp. 3–7.
14. Vasil'eva N., Bogomolova T., Vybornova I., Bosak I. (2007) Faktory patogennosti Cryptococcus neoformans i ih rol' v patogeneze kriptokokkoza [Factors of pathogenicity of Cryptococcus neoformans and their role in pathogenesis of cryptococcosis]. *Materialy IX s"ezda Vserossijskogo nauchno-prakticheskogo obshchestva epidemiologov, mikrobiologov i parazitologov* [Materials of the IX congress of All-Russian scientific-practical association of epidemiologists, microbiologists and parasitologists], 2, p. 221.
15. Vasil'eva N., Stepanova A., Sinickaya I. (2006) Ul'trastruktura kapsul zrelyh kletok shtammov Cryptococcus neoformans in vitro i in vivo [Ultrastructure of the capsules of mature cells of the Cryptococcus neoformans strains in vitro and in vivo]. *Problemy medicinskoj mikologii*, vol. 8, no 2, p. 25.
16. Koz'ko V., Gavrilov A., Zagorodneva O. (2010) Kriptokokkovaya infekciya u VICH-pozitivnyh i VICH-negativnyh lic: sostoyanie problemy [Cryptococcal infection in HIV-positive and HIV-negative persons: state of the problem]. *Medicina s'ogodni i zavtra*, 2–3 (47–48), pp. 134–139.
17. Klimko N. (2008) *Mikozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej 2-e izd.* [Mycoses: diagnostics and treatment. Guide for physicians, 2nd edition]. M.: Vi Dzhi Grupp, 336 p.
18. Klimko N. (2011) *Mikozy central'noj nervnoj sistemy* [Mycoses of the central nervous system]. SPb: Infekcionnye bolezni: problemy, dostizheniya i perspektivy.
19. Aravijskij R., Klimko N., Vasil'eva N. (2004) *Diagnostika mikofov* [Diagnostics of mycoses]. St. Petersburg: SPMAPO, p. 185.

Поступила/Received: 14.08.2019
 Контакты/Contacts: luidok@mail.ru

Бойко И.Б., Криницкая И.Я.
Тернопольский национальный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского,
Тернополь, Украина

Boiko I., Krynytska I.
I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

Усовершенствование бактериологического метода диагностики гонореи: опыт Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера, Украина

Improvement of Bacteriological Method of Diagnostics of Gonorrhoea: Experience of Ternopil Regional Clinical Dermatovenereological Dispensary, Ukraine

Резюме

Введение. Одной из самых изученных и часто встречаемых в мире инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), является гонорея, «золотым стандартом» лабораторной диагностики которой остается культуральная диагностика.

Цель. Впервые в Украине провести внешнюю оценку качества обновленной стандартной операционной процедуры культуральной диагностики *N. gonorrhoeae* для получения живых изолятов с дальнейшим исследованием их антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. Мазки, взятые для посева на *N. gonorrhoeae*, немедленно помещались в непитательную транспортную среду – агарный гель Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Бреция, Италия). Все образцы транспортировались в диагностическую лабораторию Тернопольского клинического областного кожно-венерологического диспансера, где их высевали на чашки Петри с селективным шоколадным агаром TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. Внешний контроль качества проводился в Центре сотрудничества ВОЗ по гонорее и другим ИППП (г. Эребру, Швеция).

Результаты и обсуждение. Результаты культурального исследования клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных от 141 пациента с наличием соответствующих клинических симптомов, характеризовались высоким качеством; общая частота подтвержденных гонококковых изолятов составила 96,5% (136/141).

Заключение. Применение непитательной транспортной среды – агарный гель Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Бреция, Италия) и селективный шоколадный агар TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция) – при проведении культуральной диагностики *N. gonorrhoeae* позволяет достичь надежных эксплуатационных характеристик; разработанный метод может использоваться в лабораторной практике в Украине с целью проведения стандартной диагностики гонореи и исследований на чувствительность *N. gonorrhoeae* к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, гонорея, культивирование, контроль качества, антибиотикорезистентность.

Abstract

Introduction. One of the most studied and commonly occurring sexually transmitted infections (STIs) in the world is gonorrhea, the "gold standard" of laboratory diagnostics of which is cultural diagnostics.

Purpose. To conduct, for the first time in Ukraine, the external evaluation of the quality of the updated standard operating procedure of cultural diagnostics of *N. gonorrhoeae* to obtain "live" isolates with further study of their antibiotic resistance.

Materials and methods. The swabs taken for *N. gonorrhoeae* culture were immediately placed in the non-nutritive transport environment – Amies Agar Gel Medium with charcoal (Copan Diagnostics Inc., Brescia, Italy). All samples were transported to the laboratory department of the Ternopil Regional Clinical Dermatovenereological Dispensary, where they were plated on a Petri dish with selective chocolate agar TM+PolyViteX VCAT3 media (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), according to the manufacturer's instructions. External quality control was conducted at the WHO Collaborating Centre for Gonorrhea and other Sexually Transmitted Infections (Örebro, Sweden).

Results and discussion. The results of culture studies of clinical strains of *N. gonorrhoea* isolated from 141 symptomatic patients were characterized by a high quality; the overall incidence of confirmed gonococcal isolates was 96.5% (136/141).

Conclusion. Use of non-nutritive transport environment Amies Agar Gel Medium with charcoal (Copan Diagnostics Inc., Brescia, Italy) and selective chocolate agar TM+PolyViteX VCAT3 media (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) lets to achieve reliable performance. This technique can be used in laboratory practice in Ukraine to conduct standard diagnostics of gonorrhea and studies on the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to antibacterial drugs.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, gonorrhea, cultivation, quality control, antibiotic resistance.

■ ВВЕДЕНИЕ

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежедневно во всем мире происходит миллион случаев заражения инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), а в 2016 г. 376 миллионов человек заболели излечимыми ИППП, вызываемыми *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis* [1]. Одной из самых изученных и часто встречаемых в мире ИППП является гонорея (приблизительно 78 миллионов новых случаев среди взрослых каждый год) [2–4], возбудителем которой являются грамотрицательные диплококки *N. gonorrhoeae*. Это бобовидной формы кокки, клетки которых располагаются парами, вогнутыми сторонами друг к другу. Размеры кокков – 1,25–1,60 мкм в длину и 0,7–0,8 мкм в ширину. *N. gonorrhoeae* (облигатный патоген) в большинстве случаев передается от инфицированного человека при прямом контакте слизистых оболочек [5].

Количество пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом гонококковой инфекции в Украине в 2017 г. составило 4779 человек, в том числе 1147 сельских жителей. Всего в пересчете на 100 000 населения заболеваемость гонореей в 2017 г. составила 11,3. Удельный вес мужчин – 65,2%, женщин – 34,8% [6]. При этом общепризнано,

что заболеваемость населения по крайней мере в 2 раза выше официально зарегистрированной, поскольку гонорея протекает бессимптомно у 3–5% инфицированных, а также в статистические отчеты могут не попадать пациенты от врачей частной практики.

В случае отсутствия лечения гонорея представляет значительную угрозу для здоровья; она вызывает развитие воспалительных заболеваний органов малого таза и/или внематочной беременности у женщин, слепоты у новорожденных, бесплодия у пациентов обоих полов, а также усиливает передачу вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [3, 7, 8]. У мужчин нелеченая гонорея приводит к эпидидимиту [2].

Мировая медицина сталкивается с угрожающей проблемой уникальной способности гонококков приобретать устойчивость практически ко всем лекарственным препаратам, применяемым для лечения гонореи [4]. В 2012 г. комбинированная терапия (цефтриаксон плюс азитромицин) была официально рекомендована для всех европейских стран [9], но уже в 2018 г. первые гонококковые изоляты с резистентностью к цефтриаксону и высоким уровнем резистентности к азитромицину были выявлены в Англии и Австралии [10].

Несмотря на использование молекулярных методов диагностики, культуральный метод продолжает оставаться «золотым стандартом» в Украине. При оптимальных условиях данный вид исследования имеет высокую диагностическую чувствительность и специфичность и дает возможность проводить исследование чувствительности гонококка к антибактериальным препаратам, поскольку это единственный метод, который позволяет получить живые изоляты [11, 12]. Информация по чувствительности и резистентности к антибактериальным препаратам – это надежная основа доказательной медицины, благодаря которой возможна стабильная программа антибактериальной терапии и профилактики гонореи [8].

Каждая лаборатория должна систематически проводить оценку качества используемых сред, чтобы обеспечить точность получаемых результатов [3, 12, 13]. Однако внешняя оценка качества культур *N. gonorrhoeae* в Украине проводится редко, недоступными остаются также международные эталонные штаммы для стандартных процедур внутреннего контроля качества.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Впервые в Украине провести внешнюю оценку качества обновленной стандартной операционной процедуры (СОП) культуральной диагностики *N. gonorrhoeae* для получения живых изолятов с дальнейшим исследованием их антибиотикорезистентности.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера (Тернополь, Украина) в период с июля 2013 г. по август 2018 г. В нем участвовали в основном пациенты с наличием симптомов гонореи после предоставленного информированного письменного согласия. Все пациенты, включая их половых партнеров, получали медицинскую помощь в соответствии с клиническими протоколами по лечению гонореи [14].

Изоляты гонококков высевались в соответствии с утвержденной локальной СОП [15]; никакие данные, по которым можно установить личность пациента, в этом исследовании не использовались.

В зависимости от сведений о характере половой жизни, сообщенных самим пациентом, и/или имеющихся клинических симптомов, было взято по два уретральных и/или анальных мазка (у мужчин) и по два цервикальных мазка (у женщин) для проведения микроскопии (с окрашенной метиленовым синим и по Граму) и посева на *N. gonorrhoeae*.

Мазки, взятые для посева на *N. gonorrhoeae*, немедленно помещались в непитательную транспортную среду агарный гель Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Брешиа, Италия). Все образцы временно (0,5–6 часов) хранились при комнатной температуре (20–25 °С), а затем транспортировались в течение 15 мин. в диагностическую лабораторию Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера, где биологический материал с транспортной среды высевали на чашки Петри с селективным шоколадным агаром TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция) в соответствии с инструкциями производителя.

Все транспортные и питательные культуральные среды были идентичны тем, что закупались для повседневной диагностической работы; ни один из производителей не имел влияния на дизайн, или проведение данного исследования, или на анализ его результатов.

«Свежие» клинические изоляты *N. gonorrhoeae* выделялись в соответствии с ранее описанными процедурами [16] и направлялись в Центр сотрудничества ВОЗ по диагностике и лечению гонореи и других ИППП (г. Эребру, Швеция) в трех сериях с целью проведения внешней оценки качества.

Оценка качества СОП проводилась по трем критериям: частота выделения живых изолятов после их размораживания (восстановление изолятов), частота выделения изолятов, подтвержденных как *N. gonorrhoeae*, и доля выделенных штаммов гонококков в отношении всех официально зарегистрированных случаев гонореи (общий процент выделенных штаммов). Доверительные интервалы (95% ДИ) рассчитывались методом точного биномиального распределения с помощью статистического программного обеспечения MedCalc, версия 18.11.3 (компания MedCalc Software bvba, Остенде, Бельгия).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изоляты гонококков ($n=141$), выделенные от 141 пациента, были высеяны в 2013–2018 гг. в Тернопольской области (Украина). Изоляты были получены из уретры мужчин (120/141; 85,1%), шейки матки у женщин (20/141; 14,2%), а один изолят (0,7%) был получен из прямой кишки у мужчины. Средний возраст пациентов составил 29,3 года (среднее стандартное отклонение 9 лет). У подавляющего большинства пациентов имели место выделения из мочеполовых органов (132/141, 93,6%, 95 ДИ [88,2–97]). Внешняя оценка качества СОП посева на гонорею проводилась в 3 этапа: июль 2013 г. – ноябрь 2014 г. ($n=52$; 36,9%), декабрь 2014 г. – ноябрь 2017 г. ($n=77$; 54,6%), ноябрь 2017 г. – август 2018 г. ($n=12$; 8,5%).

В целом частота восстановления изолятов *N. gonorrhoeae* была высокой (137/141; 97,2%) с незначительными отклонениями (94,8–100%) в период 2013–2018 гг. Частота наличия подтвержденных изолятов *N. gonorrhoeae* колебалась от 93,5% до 100% и обобщенно составила 96,5% (136/141), что было обусловлено наличием 4 мертвых штаммов и тем, что один штамм был идентифицирован как *Neisseria meningitidis*. Подробные результаты проведения внешнего контроля качества для культуры *N. gonorrhoeae* в 2013–2018 гг. приведены в табл. 1.

Доля выделенных штаммов *N. gonorrhoeae* относительно всех официально зарегистрированных случаев гонореи в Тернопольской области (Украина) (общий показатель выделенных штаммов) колебалась от

Таблица 1
Показатели внешнего контроля качества культуральной диагностики гонореи в Тернопольской области (Украина) в 2013–2018 гг.

Критерии качества	Периоды внешнего контроля качества											
	07.2013–11.2014, n=52			12.2014–11.2017, n=77			11.2017–08.2018, n=12			07.2013–08.2018, n=141		
	n	%	[ДИ 95]	n	%	[ДИ 95]	n	%	[ДИ 95]	n	%	[ДИ 95]
Восстановленные (живые) изоляты	52	100	[93,2–100]	73	94,8	[87,2–98,6]	12	100	[73,5–100]	137	97,2	[93–99,2]
Подтвержденные изоляты как <i>N. gonorrhoeae</i>	52	100	[93,2–100]	72	93,5	[85,5–97,9]	12	100	[73,5–100]	136	96,5	[92–98,9]
Неподтвержденные изоляты	0	0	[0–6,9]	1*	1,3	[0,03–7]	0	0	[0–26,5]	1*	0,7	[0,02–3,9]

Примечания:
n – количество;
ДИ – доверительный интервал;
* *Neisseria meningitidis*.

Таблица 2
Общий процент выделенных штаммов *N. gonorrhoeae* в Тернопольской области (Украина) в 2013–2018 гг.

Год	Зарегистрированные случаи гонореи	Выделенные штаммы <i>N. gonorrhoeae</i>		
	n	n	%	[ДИ 95%]
2013	151	14	9,3	[5,2–15,1]
2014	143	40	28,0	[20,8–36,1]
2015	115	33	28,7	[20,7–37,9]
2016	102	25	24,5	[16,5–34]
2017	93	14	15,1	[8,5–24]
2018	96	10	10,4	[5,1–18,3]
2013–2018	700	136	19,4	[16,5–22,5]

Примечания:
n – количество;
ДИ – доверительный интервал.

9,3% в 2013 г. до 24,5–28,7% в 2014–2016 гг. с последующим снижением к 10,4–15,1% в 2017–2018 гг.; обобщенно этот показатель составил 19,4% (136/700). Общие показатели выделенных штаммов *N. gonorrhoeae* в Тернопольской области (Украина) в 2013–2018 гг. приведены в табл. 2.

Гонорея, несмотря на использование эффективных противогаонкокковых препаратов, остается трудно контролируемой инфекцией [17]. На фоне широкого применения антимикробных препаратов в последние годы наблюдается тенденция к асимптомному течению гонококковой инфекции, что приводит к позднему ее выявлению, развитию осложнений, имеющих непосредственное отношение к репродуктивной способности человека, а также к затруднениям в лабораторной диагностике [18].

В лабораторной диагностике гонореи значимое место занимает бактериологический метод, который основан на микроскопии окрашенного по Граму препарата и культуральном исследовании с посевом на специальные среды [2]. При этом очень важным является как внутрилабораторный, так и внешний контроль качества. Известно, что гонококки являются довольно прихотливыми микроорганизмами. На эффективность культивирования *in vitro* могут оказывать влияние множество факторов, начиная от неправильного получения клинического материала и кончая условиями культивирования и качеством используемых питательных сред [11, 19]. Так как гонококки чувствительны к внешним факторам (высушиванию, воздействиям температуры и кислорода), рекомендуется материал, полученный от пациентов, сразу инокулировать на культуральную среду. Если это невозможно, необходимо использовать подходящую транспортную среду (референс-среду или среду, сертифицированную и валидованную для этих целей). Пробирки с инокулированным материалом должны быть помещены либо в холодильник, либо в инкубатор. Образцы должны быть доставлены в лабораторию как можно быстрее и оптимально инокулированы на ростовую среду не позднее чем через 24 часа после взятия материала (максимум – 48 часов). Транспортировка материала должна осуществляться при температуре не ниже 18 °C [5].

На жизнеспособность гонококков могут влиять разные факторы. Применение лубрикантов, спермицидных препаратов, спринцеваний, гормональных контрацептивов может отрицательно влиять на выделение гонококков. Кроме того, тампоны для взятия материала могут обладать антибактериальными свойствами. Вата, альгинат кальция, дакрон могут быть токсичными для культуры гонококков. Ненасыщенные жирные кислоты, находящиеся в ватных волокнах, хлорсодержащие отбеливатели, смола, входящая в состав деревянных палочек, клей, используемый для соединения тампонов с крышками, также могут быть токсичными для гонококков. Быстрый посев на питательные среды рекомендуется для сокращения экспозиции материала с токсическими веществами и предотвращения его высыхания. Ингредиенты среды, такие как крахмал, кровь и дрожжи, действуют как адсорбирующие вещества и также могут быть ингибиторами роста гонококков [5].

Поэтому широкое внедрение контроля качества культуральной диагностики гонореи является насущной необходимостью в Украине. С этой целью мы впервые провели внешнюю оценку качества посева на

N. gonorrhoeae в Тернопольской области (Украина), чтобы содействовать запуску программы мониторинга резистентности гонококков к антибактериальным препаратам. Внешний контроль качества проводился в три этапа и охватывал практическую деятельность отделения лабораторной диагностики Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера в течение пяти лет (2013–2018 гг.). Новая СОП посева на *N. gonorrhoeae* была введена в Тернопольском областном клиническом кожно-венерологическом диспансере в 2013 г. Эта процедура включала использование непитательной транспортной среды агарного геля Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Бреция, Италия) и селективного шоколадного агара TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция). В нашем исследовании были продемонстрированы надежные эксплуатационные характеристики внедренной СОП; при этом наблюдались высокие показатели выделения (137/141; 97,2%) и подтверждения изолятов *N. gonorrhoeae* (136/141; 96,5%), которые были даже выше, чем опубликовано в работе Adam et al. [20]. Вызывает беспокойство тот факт, что нами был выявлен один случай неправильно диагностированного уретрита, вызванного *Neisseria meningitidis* (1/141; 0,7%). Причиной неверной постановки диагноза в этом случае явилось временное отсутствие реагента для биохимической идентификации *Neisseria* spp. в отделении лабораторной диагностики Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера в сентябре 2017 г. Доля выделенных штаммов *N. gonorrhoeae* относительно всех случаев гонореи, официально зарегистрированных в Тернопольской области (Украина), в целом была приемлемой (то есть выше 10%, а именно – 19,4% (136/700)) [21]; эти данные сопоставимы с результатами, полученными другими авторами [22].

Результатом проведения этого исследования стало изменение стандартной операционной процедуры культуральной диагностики *N. gonorrhoeae*, выполнявшейся на базе Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера. Клиника диспансера начала применять агаровый гель Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Бреция, Италия), транспортную среду с предварительно подготовленным в условиях производства селективным шоколадным агаром TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция), что позволило впервые в Украине исследовать профиль гонококков относительно их резистентности к антибактериальным препаратам [16]. Учитывая показатель наличия выделенных изолятов, превышающий 10%, описанный профиль резистентности к антибактериальным препаратам можно экстраполировать на клиническую практику во всей Украине.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение непитательной транспортной среды агарного геля Амиеса с активированным углем (производства компании Soran Diagnostics Inc., г. Бреция, Италия) и селективного шоколадного агара TM+PolyViteX VCAT3 (производства компании bioMérieux, Марсе-Л'Этуаль, Франция) при проведении культуральной диагностики *N. gonorrhoeae* позволило достичь надежных эксплуатационных характеристик; созданная

методика может использоваться в лабораторной практике в Украине с целью проведения стандартной диагностики гонореи и исследований на чувствительность *N. gonorrhoeae* к антибактериальным препаратам. Выявленный случай ложного диагностирования уретрита, вызванного *N. meningitidis*, подчеркивает необходимость проведения контроля качества перед применением любой питательной среды с целью диагностики таких прихотливых микроорганизмов, как *N. gonorrhoeae*. Чтобы избежать ошибочного диагноза с *Neisseria* spp., необходимо применять биохимическую идентификацию. Имеется насущная необходимость в дальнейшем исследовании оценки культуры *N. gonorrhoeae* с включением экстрагенитальных образцов.

Благодарность

Авторы благодарят за сотрудничество и поддержку профессора Магнуса Унемо, директора Центра сотрудничества ВОЗ по гонорее и другим инфекциям, передающимся половым путем, национальной референс-лаборатории по ИППП (Эребру, Швеция), а также коллектив лабораторного и диспансерного отделений Тернопольского областного клинического кожно-венерологического диспансера.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Rowley J., Vander Hoorn S., Korenromp E. (2019) Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*, vol. 97 (8), pp. 548–562.
2. Puchenko O., Rishchuk S. (2012) The quality of diagnosis and treatment of neisserial infection. *Terra Medica*, vol. 3, pp. 21–24.
3. Cole M.J., Quaye N., Jacobsson S. (2019) Ten years of external quality assessment (EQA) of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing in Europe elucidate high reliability of data. *BMC Infectious Diseases*, vol. 19 (1), p. 281.
4. Unemo M., Del Rio C., Shafer W.M. (2016) Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. *Microbiol Spectr*, vol. 4, p. 10.
5. Kubanova A., Frigo N., Savicheva A. (2008) Laboratory protocols for the diagnosis of gonorrhea infection. *Vestn Dermatol Venerol*, vol. 1, pp. 83–97.
6. Health Institutions and the State Statistics Service of Ukraine (2018) *Morbidity of the Ukrainian population in 2017*. Statistical Collection, Kiev. Available at: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf (in Ukrainian).
7. Sánchez-Busó L., Golparian D., Corander J. (2019) The impact of antimicrobials on gonococcal evolution. *Nature microbiology*, doi: 10.1038/s41564-019-0501-y.
8. Brooks B., Patel R. (2013) European Collaborative Clinical Group (ECCG). The 2012 International Union against Sexually Transmitted Infections European Collaborative Clinical Group report on the diagnosis and management of *Neisseria gonorrhoeae* infections in Europe. *Int J STD AIDS*, vol. 24, pp. 419–422.
9. Harris S.R., Cole M.J., Spiteri G., Sánchez-Busó L., Golparian D., Jacobsson S. (2018) Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis*, vol. 18 (7), pp. 758–768.

10. Unemo M., Lahra M.M. (2019) *World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts*.
11. Shipitsyna E., Maksimova A., Gushchin A. (2008) The quality of gonococcal infection laboratory diagnostics. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, vol. LVII, no 3, pp. 60–66.
12. Unemo M. (ed.) (2013) *Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus*. Geneva: World Health Organization Document Production Services.
13. *ISO 15189:2012. Medical laboratories – Requirements for quality and competence*. Switzerland: International Organization for Standardization, 2012, section 5.6.
14. *The Order of The Ministry of Health of Ukraine N 312 from 08.05.2009 with changes and additions made 04.07.2016. Regarding Clinical Protocols of Medical Aid to Patients with Dermatovenereological Diseases*. Available at: http://old.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20090508_312.html. (in Ukrainian).
15. (1999) *Unification of research laboratory methods in the diagnostics of sexually transmitted diseases*. The Ministry of Health of Ukraine. The State Institution "Institute of Dermatology and Venereology of the National Academy of Medical Science of Ukraine", pp. 52–59.
16. Boiko I., Golparian D., Krynytska I. (2019) Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and treatment of gonorrhoea patients in Ternopil and Dnipropetrovsk regions of Ukraine, 2013–2018. *APMIS*, vol. 127 (7), pp. 503–509.
17. Kubanova A., Sekhin S., Yakushin S., Kubanov A. (2002) Antibacterial treatment of gonorrhea in the light of recent international recommendations. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 4, no 4, pp. 364–378.
18. Workowski K.A., Bolan G.A. (2015) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. 2015. *MMWR*, vol. 64, no 3.
19. Spence J.M., Wright L., Clark V.L. (2008) Laboratory Maintenance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Current Protocols in Microbiology*, vol. 8, pp. 4A.1.1–4A.1.26.
20. Adam L.B., Robert F.P., Meghan A.W. (2019) Genotypic and Phenotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: a Cross-Sectional Study of Isolates Recovered from Routine Urine Cultures in a High-Incidence Setting. *mSphere*, vol. 4 (4), pp. e00373–19.
21. European Centre for Disease Prevention and Control (2018) *Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2016*. Stockholm: ECDC. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EURO-GASP-report-2016.pdf>
22. Gratrix J., Kamruzzaman A., Martin I. (2018) Surveillance for Antimicrobial Resistance in Gonorrhoea: The Alberta Model, 2012–2016. *Antibiotics (Basel)*, vol. 7 (3), p. 63.

Поступила/Received: 28.10.2019

Контакты/Contacts: krynytska@tdmu.edu.ua

УДК 616.921.8-053.2:616.15-07

Гаврилова О.А., Астапов А.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Gavrilova O., Astapov A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Особенности изменений в общем анализе крови у привитых и непривитых детей с коклюшем: лабораторные критерии диагностики инфекционного заболевания

Features of Changes in the General Analysis of Blood in Vaccinated and Unvaccinated Children with Whooping Cough: Laboratory Criteria for Diagnostics of Infectious Disease

Резюме

Диагностика коклюша основывается на комплексе эпидемиологических и клинико-лабораторных данных. В связи с трудностями своевременного клинического распознавания лабораторные методы приобретают особую значимость, влияя непосредственно на все стороны эпидемического процесса, в том числе на раннюю верификацию случаев болезни, оперативное назначение этиотропного лечения, тем самым смягчая течение болезни и, прежде всего, предотвращая распространение инфекции. Для определения характерных для коклюшной инфекции изменений в гемограмме были проанализированы случаи заболевания коклюшем 280 детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет, проходивших стационарное лечение в учреждении здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница» Минска в период с 01.01.2011 г. до 01.01.2017 г. У всех пациентов диагноз коклюша был верифицирован лабораторно с помощью методов ИФА и/или ПЦР.

В результате исследования было установлено, что для пациентов с коклюшем в возрасте до 10 лет характерен лейкоцитоз, у детей от 10 лет и старше этот признак отсутствовал. Достоверно более высоких значений у непривитых он достигал только в возрастной группе пациентов от 1 до 5 лет. Лимфоцитоз выявлен у детей в возрасте до 5 лет, однако достоверно более высоких значений он достигал у непривитых детей первого года жизни по сравнению с привитыми. Тромбоцитоз у непривитых детей первого года жизни может быть использован для ранней диагностики коклюша. У привитых детей от 5 лет и старше выявлено снижение содержания моноцитов в гемограмме.

Установлено, что лейкоцитоз характерен для детей с коклюшем до года вне зависимости от их вакцинального статуса, у непривитых детей первого года жизни выявлен лимфоцитоз и тромбоцитоз, тогда как у привитых эти признаки отсутствовали. В возрастной группе от 1 года до 5 лет лейкоцитоз у непривитых был достоверно выше по сравнению с содержанием лейкоцитов у привитых. Для этой возрастной категории пациентов также был характерен лимфоцитоз без достоверных различий между привитыми и непривитыми. У детей от 5 до 10 лет с коклюшем продолжал сохраняться лейкоцитоз с отсутствием различий между привитыми и непривитыми. У детей 10 лет и старше характерные для коклюша изменения в общем анализе крови

по сравнению с контрольной группой отсутствовали, как и различия показателей между привитыми и непривитыми пациентами.

Ключевые слова: коклюш, дети, *Bordetella pertussis*, диагностика, гемограмма.

Abstract

Diagnostics of whooping cough is based on the set of epidemiological and clinical laboratory data. Because of the difficulties of timely clinical recognition, laboratory methods are of particular importance. They influence directly all aspects of the epidemic process, including early verification of cases of the disease, fast appointment of etiotropic treatment, thereby mitigating the course of disease and preventing the spread of infection. To determine the changes in the hemogram that are typical for pertussis infection, there were analyzed 280 cases in children at the age from 1 month to 18 years, who underwent inpatient treatment at the Children's Infectious Clinical Hospital in Minsk from 01.01.2011 to 01.01.2017. For all patients, the diagnosis of pertussis was verified laboratory using ELISA and/or PCR methods.

As a result of the study, it was found that for patients with whooping cough under the age of 10 years, leukocytosis is typical. In children from 10 years and older, this symptom was absent. It achieved significantly higher values in unvaccinated patients only in the age group of patients from 1 to 5 years. Lymphocytosis was detected in children under 5 years. However, it reached significantly higher values in unvaccinated children of the first year of life, if compared with vaccinated children. Thrombocytosis in unvaccinated children of the first year of life can be used for early diagnostics of whooping cough. In vaccinated children of 5 years and older, the decrease of the content of monocytes in the hemogram was revealed.

It was revealed that leukocytosis is typical for children with whooping cough up to a year, regardless of their vaccination status. Unvaccinated children of the first year of life showed lymphocytosis and thrombocytosis, whereas in vaccinated children, these symptoms were absent. In the age group from 1 year to 5 years, leukocytosis in the unvaccinated was significantly higher, if compared to the content of leukocytes in the vaccinated. For this age category of patients, lymphocytosis was also typical without significant differences between vaccinated and unvaccinated. In children from 5 to 10 years old with whooping cough, leukocytosis continued to persist with no difference between vaccinated and unvaccinated. In 10-year-old children and older, there were no changes in the general blood count typical for whooping cough, if compared with the control group, as well as the differences in the rates between vaccinated and unvaccinated patients.

Keywords: whooping cough, children, *Bordetella pertussis*, diagnostics, hemogram.

Изучение общего анализа крови имеет определенное значение для дифференциальной диагностики инфекционного заболевания бактериальной и вирусной природы. Для бактериальных процессов характерен лейкоцитоз с нейтрофилиезом, в то время как при вирусных инфекциях наблюдается лейкопения и лимфоцитоз. Однако встречаются заболевания, в частности коклюш, которые имеют особенности в гемограмме в виде лейкоцитоза/гиперлейкоцитоза с лимфоцитозом при нормальном показателе СОЭ. Заболевание протекает под маской респираторной инфекции, что затрудняет своевременную клиническую диагностику инфекции, вызываемой *Bordetella Pertussis*.

В настоящее время в Республике Беларусь наблюдается рост заболеваемости коклюшем у детей (33,5 на 100 тыс. детского населения

в 2018 году против 8,6 в 2000 году), поэтому ранняя ее диагностика приобретает особую эпидемиологическую значимость. Особенностью современного подъема заболеваемости коклюшем в Республике Беларусь и в мире является увеличение количества заболевших, привитых против коклюша. Нами наблюдался случай групповой заболеваемости детей, привитых против коклюша, в одном из районов Республики Беларусь [1]. Как установлено, коклюш у привитых протекал атипично, что приводило к запоздалой диагностике заболевания и госпитализации для стационарного лечения [2–4]. В лечебно-профилактическом, эпидемиологическом и организационном плане большое значение имеет своевременность диагностики на догоспитальном этапе, когда наиболее широко используются общеклинические методы диагностики. Лабораторная верификация коклюша является сложной и основывается на оценке гематологических показателей и методов специфической лабораторной диагностики. Большинство исследователей, занимавшихся изучением общего анализа крови детей, заболевших коклюшной инфекцией, отмечали увеличение содержания лейкоцитов вплоть до гиперлейкоцитоза и лимфоцитоза. Если содержание лимфоцитов и лейкоцитов имело тенденцию к увеличению, причем значительному, то для СОЭ характерны нормальные показатели [5–8].

С целью изучения характеристик гемограммы у пациентов с различным вакцинальным статусом были проанализированы случаи заболевания коклюшем. В группу исследования были включены 280 детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет, проходивших стационарное лечение в учреждении здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница» Минска (УЗ «ГДИКБ») в период с января 2011 г. по январь 2017 г. У всех пациентов диагноз коклюшной инфекции был верифицирован лабораторно с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или иммуноферментного анализа (ИФА). Пациенты группы исследования разделены на 2 подгруппы: непривитые ($n=161$) и привитые ($n=119$) против коклюша. Группа сравнения ($n=121$) сформирована из практически здоровых детей (I–II группы здоровья), не болевших в течение месяца перед забором крови для общего анализа. Различия в группе исследования и сравнения по полу ($p=0,344$) и возрасту ($p=0,905$) отсутствовали.

Большинство детей – 233 (83,2%) ребенка, госпитализированных в УЗ «ГДИКБ» с диагнозом «коклюш», выставленным при госпитализации или при последующем стационарном лечении, были направлены врачами амбулаторий, поликлиник и стационаров. Из них 121 ребенок (51,9%) направлен педиатрами амбулаторного звена. Остальной контингент пациентов был направлен как стационарами – 52 ребенка (22,3%), так и бригадами скорой медицинской помощи – 60 человек (25,8%). Без направления медицинских учреждений госпитализировано 47 (16,8%) человек.

Установлено, что с диагнозом коклюша госпитализировано только 46 (19,7%) детей. В направлениях на госпитализацию часто указывается «коклюш» в числе других заболеваний (двух, трех). Ведущим в этом перечне являлся диагноз ОРИ с поражением дыхательных путей различного уровня, иногда предполагали ОРИ неустановленной этиологии или ОРИ атипичной этиологии. Таких пациентов было 37 (15,9%).

Таблица 1
Формулировки диагнозов, указанных в направлениях на госпитализацию, детей с различным прививочным статусом, n (%)

Категория пациентов	Коклюш	ОРИ + коклюш	ОРИ	Прочие диагнозы
Не привитые, n=132	27 (20,5)	25 (18,9)	78 (59,1)	2 (1,5)
Привитые, n=101	19 (18,8)	12 (11,9)	69 (63,8)	1 (1,0)
Итого, n=233	46 (19,7)	37 (15,9)	147 (63,1)	3 (1,3)

Следовательно, коклюш был верифицирован или заподозрен в медицинских учреждениях только у 83 (35,6%) детей, а другие две трети заболевших – 150 (64,4%) человек – направлялись для стационарного лечения в УЗ «ГДИКБ» только с диагнозом ОРИ или другого заболевания (147 детей – ОРИ, 3 – прочие диагнозы). Таким образом, на догоспитальном этапе большинство детей вне зависимости от прививочного статуса не имело не только установленного диагноза, но и подозрений на коклюш. Все это приводило к запоздалой госпитализации пациентов для стационарного лечения. Так, непривитые дети поступали в учреждение здравоохранения на 14-й (8–18) день от начала заболевания, привитые – 21-е (13–30) сутки болезни.

У всех госпитализированных (280 детей) были изучены гематологические характеристики крови в связи с вакцинальным статусом. Полученные показатели общих анализов крови сопоставлены с данными группы сравнения (практически здоровые дети).

Распределение пациентов по возрастным группам проводилось в соответствии с современными взглядами на изменения крови у детей в зависимости от возраста [9–11]. Были проанализированы исследуемые показатели в четырех отдельных возрастных группах: дети в возрасте до года (n=118), 1–4 года (n=68), пациенты 5–9 лет (n=50) и 10 лет и старше (n=44).

Так, характерным для общего анализа крови в возрастной группе детей первого года жизни было достоверное увеличение лейкоцитов как у привитых, так и у непривитых по сравнению со значениями у практически здоровых детей. Достоверное повышение количества лейкоцитов в крови отмечено у детей с коклюшем средней степени тяжести (у привитых $14,0 \times 10^9/\text{л}$ (12,0–14,7), у непривитых $13,4 \times 10^9/\text{л}$ (10,9–21,6)), а уровни лейкоцитоза у детей с тяжелой степенью тяжести заболевания (у привитых $20,8 \times 10^9/\text{л}$ (13,5–29,2), у непривитых $19,2 \times 10^9/\text{л}$ (13,2–27,7)) вдвое превышают уровни содержания лейкоцитов в крови здоровых детей ($9,6 \times 10^9/\text{л}$ (7,7–10,3)). Выявлено его увеличение ($p < 0,01$) у непривитых, перенесших коклюш средней степени тяжести, по сравнению с содержанием в крови здоровых детей. Однако относительное количество моноцитов у детей обеих подгрупп не выявило статистически значимых различий в связи с вакцинальным статусом, а также по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем в этой возрастной группе может иметь прогностическое значение определение содержания тромбоцитов. У непривитых детей при среднетяжелой степени тяжести течения заболевания оно составило $397 \times 10^9/\text{л}$ (336–463), а при тяжелой – $402 \times 10^9/\text{л}$ (373–461); у привитых детей при среднетяжелой степени – $367 \times 10^9/\text{л}$

Таблица 2

Показатели морфологического состава крови у пациентов исследуемой и контрольной групп, Me (25–75), lim

Признак	Подгруппы исследования						Контрольная группа
	Привитые			Непривитые			
	Степень тяжести			Степень тяжести			
	Легкая	Средняя	Тяжелая	Легкая	Средняя	Тяжелая	
Пациенты 1-го года жизни							n=42
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	–	14,0 (12,0–14,7)***	20,8 (13,5–29,2)##	–	13,4 (10,9–21,6)###	19,2 (13,2–27,7)###	9,6 (7,7–10,3)
Лимфоциты, %	–	66 (61–69)	67 (65–72)	–	69 (61–76)##	67 (59–71)	63 (53–70)
Моноциты, %	–	6 (4–9)	6 (4–6)	–	6 (4–9)	7 (5–10)	8 (5–10)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	–	367 (320–449)	403 (257–472)	–	397 (336–463)##	402 (373–461)#	339 (316–399)
СОЭ, мм/ч	–	4 (3–4)	4 (3–4)	–	5 (3–6)	4 (3–7)	4 (3–7)
Пациенты от 1 до 5 лет жизни							n=51
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,0 (7,8–10,1)	10,4 (7,0–17,2)**.#	–	9,0÷13,6	16,7 (13,1–23,0)**.###	27,8 (16,6–37,1)##	7,4 (6,2–9,1)
Лимфоциты, %	45 (29–52)	65 (53–67)##	–	30÷55	65 (54–73)###	68 (51–79)	49 (41–58)
Моноциты, %	6 (5–6)	5 (4–6)	–	6÷10	6 (4–9)	6 (5–8)	7 (5–9)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	263 (235–343)	294 (234–344)	–	268÷322	330 (286–387)	367 (344–388)	307 (248–353)
СОЭ, мм/ч	10 (7–10)	6 (5–10)	–	7÷24	6 (5–10)	4 (3–5)	5 (2–8)
Пациенты от 5 до 10 лет							n=16
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,7 (7,7–10,8)##	11,1 (8,4–14,9)###	8,2÷15,6	–	16,0 (12,1–17,9)###	–	6,6 (5,6–7,7)
Лимфоциты, %	55 (48–59)	43 (37–51)	30÷53	–	45 (31–56)	–	50 (41–57)
Моноциты, %	4 (3–6)#	6 (4–8)#	2÷8	–	8 (7–8)	–	8 (5–9)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	275 (271–304)	306 (276–351)#	268÷290	–	304 (240–352)	–	243 (229–293)
СОЭ, мм/ч	8 (5–15)	8 (6–15)*.#	3÷9	–	5 (5–7)*	–	5 (3–9)
Пациенты 10 лет и старше							n=12
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	7,8 (6,3–10,4)	7,9 (6,2–11,6)	–	–	7,9÷14,1	–	6,8 (5,9–7,5)
Лимфоциты, %	32 (26–47)	40 (31–47)	–	–	44÷45	–	41 (35–47)
Моноциты, %	2 (2–8)#	5 (4–7)##	–	–	6÷12	–	9 (8–10)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	225 (182–276)	265 (224–287)	–	–	290÷290	–	256 (219–314)
СОЭ, мм/ч	5 (4–10)	7 (5–12)###	–	–	2÷5	–	3 (3–5)

Примечания:

данные представлены как медиана (1-й квартиль – 3-й квартиль) выборки;
 достоверность различий между привитыми и непривитыми пациентами: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;
 достоверность различий по сравнению с контрольной группой: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$;
 X – показатель содержания клеток крови в 1 мкл биологической жидкости.

(320–449), тяжелой – $403 \times 10^9/\text{л}$ (257–472). Выявленный показатель количества тромбоцитов в гемограмме непривитых детей первого года жизни достоверно отличался от содержания тромбоцитов в крови практически здоровых детей ($339 \times 10^9/\text{л}$ (316–399)). Следовательно, данные о содержании тромбоцитов в крови необходимо учитывать при диагностике коклюшной инфекции.

При анализе данных СОЭ изменений показателя как для совокупности в целом, так и для данной возрастной группы выявлено не было.

Для пациентов от 1 до 5 лет жизни также характерен лейкоцитоз, причем его уровень при заболевании среднетяжелым коклюшем у привитых и непривитых ($10,4 \times 10^9/\text{л}$ (7,0–17,2) и $16,7 \times 10^9/\text{л}$ (13,1–23,0) соответственно) детей близок к значениям, полученным у детей первого года жизни. Причем содержание лейкоцитов достигает достоверно более высоких показателей у непривитых детей ($p < 0,01$). Вместе с тем выявленное содержание лейкоцитов достоверно превышало уровень содержания лейкоцитов в крови здоровых детей ($p < 0,05$) и не зависело от прививочного статуса. Значительный лейкоцитоз в крови – $27,8 \times 10^9/\text{л}$ (16,6–37,1) – в данной возрастной группе отмечается у непривитых детей при тяжелой степени тяжести течения коклюшной инфекции, по сравнению с уровнем в контрольной группе детей он был достоверно выше ($p < 0,01$).

Определенную диагностическую роль могут сыграть сведения о лимфоцитозе у непривитых детей ($p < 0,05$). Показатель достигает значения в 65% и отличается от значений уровня лимфоцитов у детей контрольной группы со статистической достоверностью ($p < 0,05$).

Содержание тромбоцитов в этой возрастной категории не имело достоверных различий в подгруппах пациентов с различной степенью тяжести болезни и вакцинальным статусом.

В возрастной группе от 5 до 10 лет у детей картина крови становится более сглаженной и уровни лейкоцитов при среднетяжелом коклюше (у привитых $11,1 \times 10^9/\text{л}$ (8,4–14,9), у непривитых $16,0 \times 10^9/\text{л}$ (12,1–17,9)) достоверно ($p < 0,001$) превышали содержание их у детей контрольной группы ($6,6 \times 10^9/\text{л}$ (5,6–7,7)) ($p < 0,05$). Содержание лимфоцитов не отличалось от их уровня в контрольной группе, и не было различий в зависимости от вакцинального статуса. Однако у привитых заболевших коклюшем детей количество моноцитов превысило аналогичный показатель у здоровых детей ($p < 0,05$).

У детей, заболевших коклюшем в возрасте 10–17 лет, морфологические показатели общего анализа крови не отличались от данных контрольной группы по содержанию лейкоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов, в том числе и с различным вакцинальным статусом. Отмечено только лишь снижение содержания моноцитов у привитых заболевших по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таким образом, данные общего анализа крови могут быть использованы для верификации коклюша и характеристики тяжести его течения. Наибольшее значение для диагностики коклюша имеет содержание лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов, однако уровни этих показателей различаются в зависимости от прививочного статуса и возраста заболевших коклюшем.

Так, у привитых и непривитых детей первого года жизни отмечен лейкоцитоз по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). Тромбоцитоз при коклюше выявлен у непривитых пациентов первого года жизни по сравнению с группой практически здоровых детей ($p < 0,05$). Лимфоцитоз у непривитых достигал 69% по сравнению с уровнем контрольной группы ($p < 0,01$).

У детей 1–5 лет со среднетяжелым и тяжелым коклюшем содержание лейкоцитов превышало показатель группы практически здоровых детей ($p < 0,001$), причем лейкоцитоз достигал достоверно более высоких значений у непривитых пациентов ($p < 0,01$). У заболевших детей данной возрастной группы также отмечен лимфоцитоз ($p < 0,001$) без достоверных различий между детьми с различным вакцинальным статусом.

Пациенты от 5 до 10 лет жизни вне зависимости от их вакцинального статуса в общем анализе крови имели повышенное содержание лейкоцитов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), однако различия между привитыми и непривитыми детьми отсутствовали. Выявлено уменьшенное количество моноцитов у привитых детей по сравнению с практически здоровыми детьми ($p < 0,05$). Обратная зависимость установлена для показателя СОЭ – у непривитых детей он был ниже, чем у привитых ($p < 0,05$).

У привитых и непривитых заболевших в возрасте от 10 лет и старше изменения в общем анализе крови отсутствовали. Однако отмечено снижение содержания моноцитов в группе привитых детей по сравнению с данными контрольной группы ($p < 0,05$).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лейкоцитоз характерен для пациентов с коклюшем в возрасте до 10 лет, у детей от 10 лет и старше этот признак отсутствовал. Достоверно более высоких значений у непривитых он достигал только в возрастной группе пациентов от 1 до 5 лет. Лимфоцитоз выявлен у заболевших детей в возрасте до 5 лет, однако достоверно более высоких значений он достигал у непривитых детей первого года жизни по сравнению с привитыми. Тромбоцитоз у непривитых детей первого года жизни может быть использован как тест для ранней диагностики коклюша. У привитых детей от 5 лет и старше выявлено снижение содержания моноцитов в общем анализе крови.

Следовательно, значения показателей общего анализа крови отличаются у привитых и непривитых детей различного возраста с коклюшем. В то время как лейкоцитоз характерен для всех детей до года вне зависимости от их вакцинального статуса, у непривитых детей первого года жизни выявлен лимфоцитоз и тромбоцитоз, тогда как у привитых эти признаки отсутствовали. В возрастной группе от 1 года до 5 лет лейкоцитоз у непривитых был достоверно выше по сравнению с содержанием лейкоцитов у привитых заболевших. Для этой возрастной категории пациентов также был характерен лимфоцитоз без достоверных различий между привитыми и непривитыми. У детей от 5 до 10 лет с коклюшем продолжал сохраняться лейкоцитоз, однако прививочный статус не имел влияния на уровень данного показателя. У детей 10 лет и старше специфические изменения в общем анализе крови по

сравнению с контрольной группой отсутствовали, как и различия показателей между привитыми и непривитыми пациентами. До появления характерных для коклюша симптомов заболевание протекает как респираторная инфекция вирусной этиологии, и при выявлении лейкоцитоза в крови у детей до 10 лет их необходимо госпитализировать для стационарного лечения с подозрением на коклюш, что особенно важно для организованных коллективов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Gavriloва O.A., Astapov A.A., Shmeleva N.D., Kolodkina V.L., Martynov V.S. (2017) The case of collective whooping cough among vaccinated children in an organized team. *Zdravoohranenie*, vol. 2, pp. 75–80
2. Fisenko E.G., Logot'ko V.A., Glinskaja I.N., Volosar' L.A., Tihon A.K., Kretova S.F., Vojtovich I.I., Germanenko I.G., Chistenko G.N., Kolodkina V.L. (2012) Immunostructure to whooping cough among children in Minsk. *Medicinskij zhurnal*, no. 3, pp. 128–131.
3. Wagner B., Melzer H., Freymüller G., Stumvoll S., Rendi-Wagner P., Paulke-Korinek M., Repa A., Mooi F.R., Kollaritsch H., Mittermayer H., Kessler H.H., Stanek G., Steinborn R., Duchêne M., Wiedermann U. (2015) Genetic Variation of *Bordetella pertussis* in Austria. *PLOS ONE*, vol. 10, no 7, p. e0132623.
4. (2015) *State report on the state of sanitary and epidemiological welfare of the population of the Russian Federation in 2014*. M.: Feder. sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka, 206 p.
5. Kaplina T.A. (2001) *Kliniko-patogeneticheskoe znachenie pokazatelej perekisnogo okislenija lipidov i antioksidantnoj zashhity u bol'nyh kokljushem detej* [Clinical and pathogenetic value of lipid peroxidation and antioxidant protection in children with whooping cough] (PhD Thesis), Sankt-Peterburg: St. Petersburg State Pediatric Medical Academy.
6. Babachenko I.V. (2006) Kliniko-laboratornye osobennosti kokljushnoj infekcii u privityh detej [Clinical and laboratory features of pertussis infection in vaccinated children]. *Detskie infekcii*, vol. 5, no 2, pp. 22–26.
7. Bayhan G.I. (2012) The clinical characteristics and treatment of pertussis patients in a tertiary center over a four-year period. *Turk. J. Pediatr*, vol. 54, no 6, pp. 596–604.
8. Eltermann, T., Wossner R., Liese J., Wieg C., Wirbelauer J., Thomas W. (2012) Fatal pertussis in a preterm with hyperleukocytosis and necrotizing enterocolitis: considerations on pathogenesis and prevention. *Clinical Pediatrics*, vol. 224, no 7, pp. 461–462.
9. Kubarko A.I., Pereverzev V.A., Pereverzeva E.V., Azarova L.A. (1997) *Fiziologicheskaja i klinicheskaja ocenka nekotoryh pokazatelej obshhego analiza krvi, poluchaemogo s pomoshh'ju sovremennyh gematologicheskikh analizatorov* [Physiological and clinical evaluation of some indicators of general blood analysis, received with the help of modern hematological analyzers]: metod. razrab. dlja prepodavatelej i studentov med. intov. Minskij gosudarstvennyj medicinskij institut, Minsk, pp. 5–10. (in Russian).
10. Safina A.I., Zakirov I.I. (2011) *Obshhij analiz krvi v praktike pediatra i neonatologa* [General blood test in the practice of pediatrician and neonatologist]: ucheb. posobie dlja vrachej. Kazan. gos. med. akad., Kazan, pp. 14–22 (in Russian)
11. Rozenberg V.Ja., Butyl'skij A.N., Kuznik B.I. (2011) *Vozrastnaja dinamika pokazatelej gemogrammy i immunogo statusa u detej razlichnogo vozrasta* [Age dynamics of hemogram and immune status in children of different ages]. *Medicinskaja immunologija: Oficial'nyj zhurnal Sankt-Peterburgskogo Regional'nogo otdelenija Rossijskoj asociacii allergologov i klinicheskikh immunologov*, vol. 13, no 2–3, pp. 261–266.

Поступила/Received: 31.07.2019

Контакты/Contacts: childinfect@bsmu.by, dr.o_a_gavrilo@mail.ru

УДК 618.714-074

Верес И.А., Пересада О.А., Юрага Т.М.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Veres I., Peresada O., Yuraga T.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Биохимические критерии послеродовой субинволюции матки

Biochemical Criteria of Postpartum Uterine Subinvolution

Резюме

Введение. Послеродовая субинволюция матки (ПСМ) является одной из причин гипотонических маточных кровотечений и развития гнойно-септических осложнений.

Цель. Определение содержания прогестерона, пролактина, оксида азота и общего кальция в крови родильниц при нарушении сократительной функции матки и установление биохимических критериев субинволюции матки после родов.

Материалы и методы. Проведено обследование 177 пациенток (средний возраст $25,1 \pm 2,3$ года), которые составили три группы в соответствии с клиническими вариантами течения ПСМ: 1-я группа – 58 родильниц с ПСМ без клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса; 2-я группа – 61 родильница с ПСМ с умеренными признаками воспаления; 3-я группа – 38 родильниц с клинической манифестацией ГПЭ. Контрольную группу составили 20 женщин с неосложненным течением послеродового периода.

Результаты и обсуждение. В результате исследований установлено: при субинволюции матки происходит увеличение содержания прогестерона – до $8,5 \pm 0,61$ нмоль/л ($p=0,013$) в сильной прямой ассоциативной взаимосвязи с размером полости матки (коэффициент корреляции $r=0,98$; $p=0,001$; 95%-й доверительный интервал) на фоне снижения содержания пролактина до $4,0 \pm 1,0$ мкМЕ/л ($p=0,041$) и общего кальция до $2,07 \pm 0,05$ ммоль/л ($p=0,047$) по сравнению с данными здоровых родильниц. При гипотоническом эндометрите выявлено повышение уровня прогестерона до $8,1 \pm 0,54$ нмоль/л ($p=0,012$) в умеренной прямой ассоциативной взаимосвязи с размером полости матки (коэффициент корреляции $r=0,59$; $p=0,024$; 95%-й доверительный интервал) и повышение содержания оксида азота в 1,4 раза в сравнении с его уровнем при субинволюции матки ($p=0,034$). Показано, что диагностическая чувствительность (ДЧ) и диагностическая специфичность (ДС) теста установления ПСМ по определению уровня прогестерона сыворотки крови (при пороговом значении 7,9 нмоль/л) составляет 91,7 и 90,0%, что характеризует высокую диагностическую надежность этого лабораторного теста.

Заключение. Изучение связи между характером изменения показателей содержания прогестерона, пролактина, оксида азота и общего кальция в сыворотке крови и сократительной активностью миометрия имеет существенное значение для установления патогенеза послеродовой субинволюции матки и эндометрита. Ее диагностике во многом способствует использование теста определения прогестерона в сыворотке крови: при пороговом значении показателя 7,9 нмоль/л диагностическая чувствительность (ДЧ) и диагностическая специфичность (ДС) составляют 91,7% и 90,0% соответственно.

Ключевые слова: прогестерон, пролактин, оксид азота, общий кальций, послеродовый гипотонический эндометрит, послеродовая субинволюция матки.

Abstract

Introduction. Postpartum uterine subinvolution (PSM) is one of the causes of hypotonic uterine bleeding and development of purulent-septic complications.

Purpose. To determine the content of progesterone, prolactin, nitric oxide and total calcium in the puerperas in violation of the contractile function of the uterus. Determination of biochemical criteria of uterine subinvolution after childbirth.

Materials and methods. There were examined 177 patients (average age – 25.1 ± 2.3 years), who made three groups in accordance with the clinical variants of the PSM course: group 1 (58 puerperas with PSM without clinical signs of inflammatory process); 2nd group (61 puerperas with PSM with moderate signs of inflammation); 3rd group (38 puerperas with clinical manifestation of GGE). The control group consisted of 20 women with uncomplicated postpartum period.

Results and discussion. After the studies, the following was revealed: in uterine subinvolution, the content of progesterone increases to 8.5 ± 0.61 nmol/L ($p=0.013$) in a strong direct associative relationship with the size of the uterine cavity (correlation coefficient $r=0.98$; $p=0.001$; 95% confidence interval) on the background of decrease of prolactin content to 4.0 ± 1.0 μ MU/L ($p=0.041$) and total calcium to 2.07 ± 0.05 mmol/L ($p=0.047$), if compared with the data of healthy puerperas. In hypotonic endometritis, the increase of progesterone level to 8.1 ± 0.54 nmol/L ($p=0.012$) was revealed in a moderate direct associative relationship with the size of the uterine cavity (correlation coefficient $r=0.59$; $p=0.024$; 95% confidence interval) and the increase of the content of nitric oxide by 1.4 times in comparison with its level during subinvolution of the uterus ($p=0.034$). It was showed that diagnostic sensitivity (DF) and diagnostic specificity (DS) of the PSM test for determination of serum progesterone level (at the threshold value 7,9 nmol/L) are 91.7 and 90.0%, which characterizes high diagnostic reliability of this laboratory test.

Conclusion. The study of the relationship between the nature of changes of the levels of progesterone, prolactin, nitric oxide and total calcium in the blood serum and contractile activity of the myometrium is essential for establishing the pathogenesis of postpartum subinvolution of the uterus and endometritis. Its diagnostics is largely facilitated by the use of the serum progesterone test: with a threshold value of 7.9 nmol/L, diagnostic sensitivity (DF) and diagnostic specificity (DI) of 91.7% and 90.0%, respectively.

Keywords: progesterone, prolactin, nitric oxide, total calcium, postpartum hypotonic endometritis, postpartum uterine subinvolution.

■ ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой акушерства продолжает оставаться материнская заболеваемость, обусловленная нарушением сократительной способности матки после родов. В структуре послеродовых осложнений доля послеродовой субинволюции матки (ПСМ) составляет 33%, при этом доказано, что ПСМ является одной из причин гипотонических маточных кровотечений [1–3]. Актуальность данной патологии также обусловлена высоким риском развития гипотонического эндометрита (ГПЭ) на фоне ослабления сократительной функции матки [4].

Известно, что послеродовой период характеризуется морфологическими изменениями в репродуктивной системе, интенсивной перестройкой всего организма, что регулируется сложными нейрогуморальными механизмами [5]. Характер инволюции послеродовой

матки во многом зависит от состояния гормонально-метаболического гомеостаза и нервно-мышечного тонуса миометрия [6]. Известно, что прогестерон является основным гормоном, ответственным за пролонгирование беременности, так как именно он блокирует сократительную способность гладкой мускулатуры беременной матки [5, 6]. Прогестерон представляет собой ключевое метаболическое звено в синтезе других эндогенных стероидов, в том числе половых гормонов и кортикостероидов, в качестве нейростероида он играет важную роль в функционировании ЦНС. Кроме того, прогестерон выступает в роли частичного агониста глюкокортикоидного рецептора, оказывая кортизолподобные эффекты.

Ряд исследований придает первостепенное значение характеру биохимических процессов в эндометрии, протекающих при патологии сократительной функции матки [7, 8]. Особую роль имеют факторы, регулирующие содержание ионов кальция в экстра- и интрацеллюлярном пространстве, так как при слабости родовой деятельности содержание ионизированного кальция в крови значительно снижается, а при стремительных родах его уровень повышается [7].

В исследованиях Simoncini T. et al. (2006) показано, что во время беременности эндогенный прогестерон увеличивает уровень эндотелиальной NO-синтазы, обеспечивая продукцию вазодилатора NO, благодаря чему происходит снижение тонуса гладких миоцитов спиралевидных артерий матки [9].

Имеются данные о том, что монооксид азота (NO) участвует в расслаблении гладких мышц матки, тормозит их сокращение при беременности и играет роль релаксанта цервикального канала в родах [10]. Эффект NO реализуется не только путем активации цитоплазматической гуанилатциклазы, что ведет к синтезу циклического гуанилмонофосфата, вызывающему падение концентрации ионов кальция (Ca^{2+}) в клетке [11]. Исходя из современных представлений о механизме действия ингибиторов кальциевых каналов, можно предположить, что NO-индуцированная релаксация гладких миоцитов матки человека может сохраняться путем прямой или косвенной активации одного или нескольких кальциевых каналов.

В работах зарубежных исследователей на препаратах миометрия крыс показано, что при воздействии нитропруссиды снижается сила сокращений миоцитов и угнетается фосфорилирование легких цепей миозина [9]. Отмечено также, что гладкая мускулатура миометрия не менее чувствительна к действию NO, чем гладкая мускулатура сосудов. Авторами также установлено, что NO действует паракринным образом во взаимосвязи с прогестероном, в результате чего достигается релаксирующий эффект на миометрий в течение беременности.

Таким образом, дальнейшее изучение влияния активирующих и ингибирующих факторов на сократительную активность послеродового миометрия имеет большое значение для установления патогенеза ПСМ и ГПЭ, а также разработки методов их лечения. В доступной литературе отсутствуют сведения по изучению пролактина, прогестерона, оксида азота и ионов кальция в сыворотке крови родильниц в послеродовом периоде.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализировать содержание прогестерона, пролактина, оксида азота и общего кальция в крови родильниц при нарушении сократительной функции матки и установить биохимические критерии субинволюции матки после родов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 177 пациенток (средний возраст $25,1 \pm 2,3$ года), родоразрешенных в 3-й ГКБ имени Е.В. Клумова г. Минска в период с 01.01.2018 по 01.02.2019, в физиологическом послеродовом отделении и отделении послеродовых осложнений. Критериями включения в исследование явились одноплодные роды живым доношенным плодом. Субинволюция матки у обследуемых женщин была диагностирована на 3-и сутки после самопроизвольных родов или на 5-е сутки после кесарева сечения. ГПЭ у родильниц диагностировали на 6–8-е сутки послеродового периода. Получено информированное согласие у всех родильниц на проведение исследований.

Все пациентки были разделены на три группы в соответствии с клиническими вариантами течения ПСМ: 1-я группа – 58 родильниц с ПСМ без клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса (средний возраст $24,6 \pm 2,7$ года); 2-я группа – 61 родильница с ПСМ с умеренными признаками воспаления (средний возраст $25,0 \pm 2,1$ года); 3-я группа включала 38 родильниц с клинической манифестацией ГПЭ (средний возраст $25,6 \pm 2,2$ года). Контрольную группу составили 20 женщин с неосложненным течением послеродового периода (средний возраст $24,2 \pm 2,3$ года).

Пациентки всех групп были сопоставимы по возрасту. У родильниц собирали сведения о перенесенных экстрагенитальных и гинекологических заболеваниях, характере менструального цикла, течении беременности по триместрам, особенностях родов и динамике послеродового периода. Изучение послеродового периода включало анализ жалоб и общего самочувствия, термометрию тела, выявление тахикардии и левого синдрома, установление характера лохий, выполнение общего анализа крови (подсчет количества лейкоцитов, определение лейкоцитарной формулы, скорости оседания эритроцитов).

Взятие венозной крови у родильниц с ПСМ и контрольной группы осуществляли на 3–4-е сутки после родов, при ГПЭ – на 6–8-е сутки. Определение концентрации ионов калия (K^+), натрия (Na^+) и общего Ca^{2+} в сыворотке крови проводили на биохимическом анализаторе Clima, Испания [12]. Исследование содержания пролактина, прогестерона, оксида азота в сыворотке осуществляли иммуноферментным методом на иммуноферментном анализаторе «Витязь Ф300» (Республика Беларусь) с использованием наборов реагентов «ДС-ИФА-Пролактин», «ДС-ИФА-прогестерон»; «Human Nitric Oxide ELISA Kit», Bioassay Technology Laboratory.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза на аппарате SonoAse 8000 проводили всем родильницам на 3–5-е сутки послеродового периода и при поступлении в отделение послеродовых осложнений. Измеряли продольный, поперечный и передне-задний размер тела матки, а также передне-задний размер полости матки, измеренный

в сагиттальной плоскости. Полученные результаты сравнивали с параметрами родильниц контрольной группы.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 12.6. Переменные, имеющие нормальное распределение, выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD) и сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа. При сравнении частотных распределений в группах использовали критерий χ^2 с поправкой на непрерывность. Характер связи между явлениями оценивали путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (r). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления факторов риска развития субинволюции матки был проведен анализ клинико-anamnestических данных родильниц с ПСМ без воспаления и с ПСМ при умеренных признаках воспаления. В результате установлены следующие статистически значимые факторы риска развития маточной субинволюции без клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса: поздний возраст родильницы, эндокринопатии, ожирение, рубцы на матке, миома матки, анемия, гестоз, фетоплацентарная недостаточность, синдром задержки развития плода, многоводие, индуцированные роды, крупный плод, затяжные роды, угроза прерывания беременности, кесарево сечение и субинволюция матки в анамнезе. Выявлены факторы, способствующие формированию инфицированной ПСМ: сопутствующие воспалительные экстрагенитальные заболевания, воспалительные заболевания органов малого таза, гестационный пиелонефрит с обострениями, многоводие, воспалительные изменения в последе, а также длительный безводный период, клиника хориоамнионита в родах или во время беременности, невынашивание беременности. Изучение факторов риска развития ГПЭ проведено нами ранее [13].

Анализ жалоб показал, что ни у одной родильницы 1-й группы с ПСМ не отмечалось повышение температуры тела и нарушение общего самочувствия, в то время как у пациенток 2-й группы с ПСМ в 95,1% случаев наблюдалось повышение температуры тела до субфебрильных цифр. У 78,9% родильниц с ГПЭ регистрировали умеренно высокую и высокую температуру тела, а также отмечали жалобы на общую слабость в 94,7% случаев и патологический характер лохий у 100% обследованных. Все пациентки 1-й группы жаловались на незначительные боли внизу живота, пациентки 2-й группы – на умеренные боли в 98,4% случаев, все родильницы с ГПЭ отмечали боли умеренного или интенсивного характера. При бимануальном обследовании у родильниц 1-й группы матка была незначительно болезненная, у представительниц 2-й группы ПСМ – умеренно болезненная, при эндометрите – умеренно или сильно болезненная.

Для родильниц 2-й и 3-й групп было характерно наличие лейкоцитоза с повышением количества палочкоядерных нейтрофилов (более выраженного у женщин 3-й группы).

Сравнительный анализ размера полости матки во всех группах исследования показал значимое превышение контрольного уровня в

4,5, 8,0 и 9,1 раза соответственно, составляющего всего $2,13 \pm 0,42$ мм ($p=0,022; 0,001; 0,001$ соответственно).

Значения прогестерона, пролактина, NO и электролитов до начала терапии в контрольной группе, у родильниц с ПСМ без клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса и с ГПЭ представлены в таблице.

Согласно данным таблицы, содержание NO у родильниц с ПСМ и контрольной группы не имело значимых различий, в то время как у родильниц с ГПЭ наблюдалось его повышение в сравнении с параметрами здоровых женщин на 32,8% ($p=0,021$). Межгрупповое сравнение показало, что у родильниц с ГПЭ концентрация NO достоверно превышала таковую у родильниц с ПСМ в 1,4 раза – $24,7 \pm 1,22$ против $17,8 \pm 1,10$ соответственно ($p=0,034$). По-видимому, при воспалительном процессе в эндометрии макрофаги и нейтрофилы крови синтезируют фермент NO-синтазу, за счет чего повышается уровень индуцибельного NO, оказывающего цитотоксическое и цитолитическое действие на бактериальные клетки [14].

Исследованиями последних лет показано, что NO является высокоактивным межклеточным посредником и фактором эндогенной защиты от повреждающих воздействий за счет обеспечения передачи сигналов в центральной и периферической нервной системе, поддержания нормального сосудистого тонуса, атромбогенности эндотелия, эффективного функционирования иммунной системы [15, 16].

Биохимические параметры у родильниц различных групп исследования до начала терапии (M±SD)

Показатель	Контрольная группа (n=20)	ПСМ без воспаления (n=25)	ГПЭ (n=24)
Прогестерон, нмоль/л	2,0±0,2	8,5±0,6 p=0,013 p ₁ – НЗ	8,1±0,5 p=0,012
Пролактин, мкМЕ/л	5,2±1,1	4,0±1,0 p=0,041 p ₁ – НЗ	3,8±1,0 p=0,037
NO, мкмоль/л	16,6±1,0	17,8±1,1 p – НЗ p ₁ =0,034	24,7±1,22 p=0,021
Ca ²⁺ , ммоль/л	2,97±0,02	2,07±0,05 p=0,046 p ₁ – НЗ	2,0±0,04 p=0,043
K ⁺ , ммоль/л	4,9±0,3	5,1±0,5 p – НЗ p ₁ – НЗ	5,2±0,4 p – НЗ
Na ⁺ , ммоль/л	140,7±4,2	149,4±4,5 p – НЗ p ₁ – НЗ	150,1±4,4 p – НЗ

Примечания:

p – статистически значимая разница между данными пациентов основных групп и контрольными значениями;

p₁ – статистически значимая разница между данными пациентов с ПСМ и ГПЭ;

НЗ – различия между группами статистически незначимы.

Известно, что сокращение миометрия происходит за счет клеточного взаимодействия, которое достигается путем образования межклеточных GAP-соединений между соседними клеточными мембранами [11]. Активируют формирование межклеточных контактов гормоны: эстрогены стимулируют их образование, прогестерон и окситоцин – предотвращают. В ходе исследования установлено, что при клинических проявлениях гипотонии матки у рожениц с ПСМ и ГПЭ содержание прогестерона превышало уровень этого показателя в контрольной группе ($2,0 \pm 0,16$ нмоль/л) более чем в 4,25 раза – соответственно $8,5 \pm 0,6$ ($p=0,013$) и $8,1 \pm 0,5$ ($p=0,012$) нмоль/л. Показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста при указанном пороговом значении 7,9 нмоль/л составили 91,7% и 90,0% соответственно, что отражает высокую диагностическую надежность теста определения прогестерона [17]. На фоне высокого содержания прогестерона у кормящих рожениц диагностировано умеренное снижение уровня пролактина по сравнению с контрольной группой, что представлено в таблице.

На рис. 1 и 2 представлена прямая корреляционная зависимость между размером полости матки и уровнем прогестерона в крови у рожениц с ПСМ ($r=0,98$; $p=0,001$) и ГПЭ ($r=0,59$; $p=0,024$) соответственно. Выявленная тесная взаимосвязь между выраженностью ПСМ и уровнем

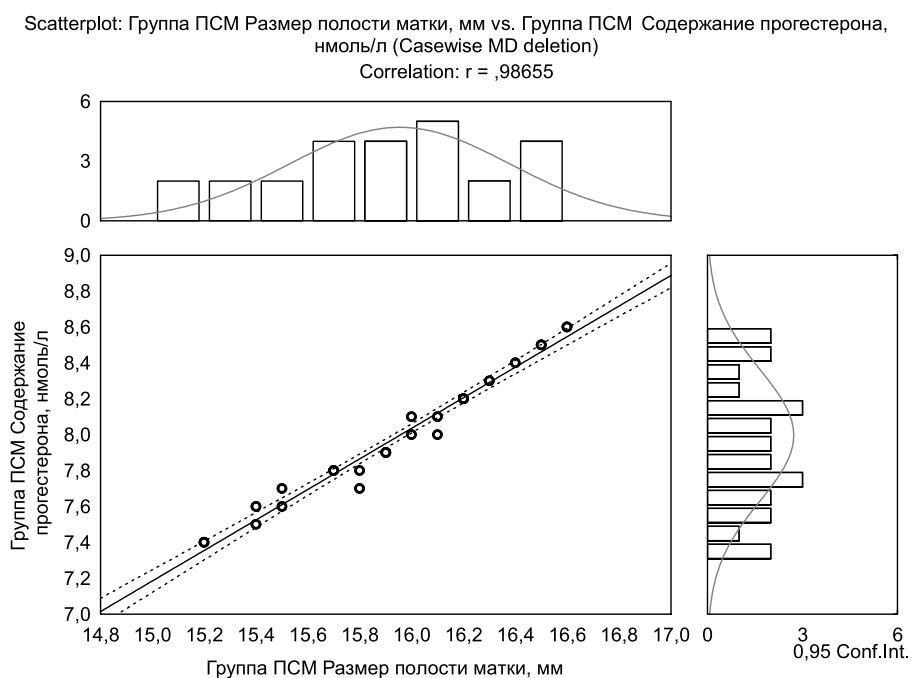


Рис. 1. Корреляционная зависимость между содержанием прогестерона и размером полости матки у рожениц с ПСМ (коэффициент корреляции $r=0,98$; $p=0,001$; 95%-й доверительный интервал)

прогестерона у пациенток с ПСМ может свидетельствовать о влиянии прогестерона на тонус маточной мускулатуры в виде его снижения при субинволюции матки на 3–4-е сутки после родов. При этом на 6–8-е сутки послеродового периода у пациенток с эндометритом на фоне маточной субинволюции установлен умеренный характер ассоциации между возрастанием прогестерона и размером полости матки, что указывает, возможно, на снижение эффекторного влияния гестагенов на рецепторный аппарат миометрия при развитии местной воспалительной реакции.

В работе Кузьминых Т.У. с соавт. (2019) установлено, что одним из механизмов слабости родовой деятельности является дисбаланс между ингибирующими и активирующими факторами сократительной деятельности миометрия на фоне снижения относительной площади экспрессии молекул адгезии CD 51, CD 61 и протеина межклеточных контактов коннексина-43 в миометрии с одновременным увеличением площади экспрессии NO-синтазы по сравнению данными, полученными у женщин с доношенным сроком физиологической беременности [8].

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Захаровой В.Ю. (2011), показавшей, что применение антигестагенов для подготовки родовых путей снижает частоту развития слабости родовой

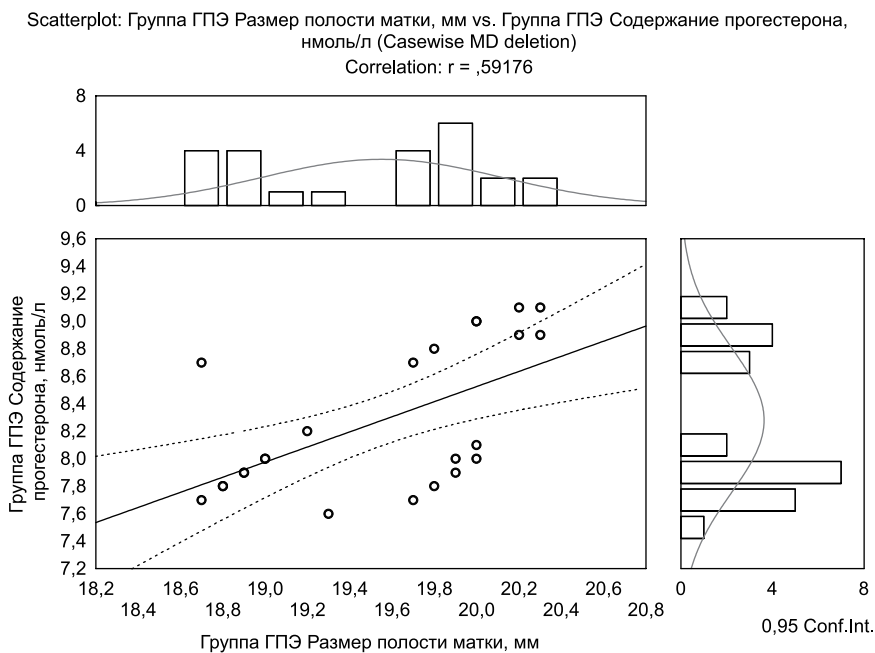


Рис. 2. Корреляционная зависимость между содержанием прогестерона и размером полости матки у рожениц с ГПЭ (коэффициент корреляции $r=0,59$; $p=0,024$; 95%-й доверительный интервал)

деятельности в 3 раза по сравнению с традиционными методами ее коррекции [18]. В диссертационной работе Подтетенева А.Д. (2003) при абдоминальном родоразрешении женщин установлены высокие показатели метаболитов прогестерона в моче (за 6 часов) в связи с неэффективностью лечения слабости родовой деятельности препаратами гестагенов (прегнадиола – $22,4 \pm 4,3$ мкмоль/л против $12,3 \pm 2,1$ мкмоль/л при физиологических родах ($p < 0,001$) и прегнанолон – $13,3 \pm 4,2$ мкмоль/л против $2,5 \pm 0,4$ мкмоль/л в контроле ($p < 0,001$) [19].

Известно, что сокращение миометрия происходит за счет превращения химической энергии в механическую при определенном содержании микроэлементов, в частности ионов кальция, стимулирующих сократительную способность матки [7]. В результате проведенного исследования при ПСМ и ГПЭ выявлено снижение концентрации ионов кальция в крови до $2,07 \pm 0,05$ и $2,0 \pm 0,04$ ммоль/л соответственно, против $2,97 \pm 0,02$ ммоль/л в контрольной группе ($p = 0,046$ и $p = 0,043$ соответственно). Определение концентрации ионов K^+ и Na^+ в сыворотке крови родильниц показало отсутствие достоверных изменений в их содержании. В исследовании Баимбетовой Ш.К. (2004) установлено, что развитию быстрого течения родов предшествовало в III триместре беременности повышение уровня ионизированного кальция в крови более $1,08 \pm 0,04$ ммоль/л по сравнению с физиологическими родами ($p = 0,001$) [7].

Таким образом, выраженность клинической симптоматики при субинволюции матки ассоциирована с интенсивностью регуляторного нейрогуморального воздействия прогестерона, что отражает его значимую роль в механизме формирования ПСМ у родильниц на 3–4-е сутки после родов.

Использование в практической деятельности врачей установленных нами различий в содержании NO в сыворотке крови пациенток с послеродовым эндометритом и субинволюцией может способствовать повышению эффективности дифференциальной диагностики этих патологических состояний.

■ ВЫВОДЫ

1. При субинволюции матки на 3–4-е сутки после родов в сыворотке крови пациенток установлено увеличение содержания прогестерона до $8,5 \pm 0,61$ нмоль/л ($p = 0,013$) в сильной прямой ассоциативной взаимосвязи с размером полости матки (коэффициент корреляции $r = 0,98$; $p = 0,001$; 95%-й доверительный интервал), снижение содержания общего кальция до $2,07 \pm 0,05$ ммоль/л ($p = 0,046$) и пролактина до $4,0 \pm 1,0$ мкМЕ/л ($p = 0,041$) по сравнению с данными здоровых родильниц.
2. При гипотоническом эндометрите на 6–8-е сутки после родов в сыворотке пациенток выявлено повышение уровня прогестерона до $8,1 \pm 0,54$ нмоль/л ($p = 0,012$) в умеренной прямой ассоциативной взаимосвязи с размером полости матки (коэффициент корреляции $r = 0,59$; $p = 0,024$; 95%-й доверительный интервал), снижение концентрации общего кальция до $2,0 \pm 0,04$ ммоль/л ($p = 0,043$) и пролактина до $3,8 \pm 1,0$ мкМЕ/л ($p = 0,037$) по сравнению с данными здоровых родильниц.

3. Установленные при послеродовой субинволюции матки высокие значения показателей диагностической чувствительности (91,7%) и диагностической специфичности (90,0%) теста определения концентрации прогестерона в сыворотке крови (при его уровне, превышающем пороговое значение 7,9 нмоль/л) служат основанием к его широкому применению для установления этой формы акушерской патологии.
4. Повышение уровня NO является одним из информативных тестов дифференциальной диагностики послеродового эндометрита и субинволюции матки. Уровень NO в сыворотке крови пациенток с гипотоническим послеродовым эндометритом превышает аналогичный параметр при субинволюции матки в 1,4 раза – $24,7 \pm 1,22$ против $17,8 \pm 1,10$ соответственно ($p=0,034$).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Morozova N. (2009) Sovremennyy vzglyad na problemu subinvolyutsii матки [A modern view of the problem of uterine subinvolution]. *Novosti meditsiny i farmatsii – akusherstvo, ginekologiya, reproduktologiya*, vol. 13, no 296, pp. 42–48.
2. Strizhakov A. (2004) Infektsionno-vospalitel'nyye zabolevaniya [Infectious and inflammatory diseases]. *Fiziologiya i patologiya poslerodovogo perioda* [Physiology and pathology of postpartum period]. M.: ID «Dinastiya», 70–84 p.
3. Chernukha Ye. (2006) *Normal'nyy i patologicheskiy poslerodovyy period* [Normal and pathological postpartum period]. M.: «GEOTAR – Media», 260 p.
4. Veres I. (2018) Gipotonicheskiy poslerodovyy endometrit: obosnovaniye, diagnostika [Hypotonic postpartum endometritis: rationale, diagnostics]. *Meditsinskiy zhurnal*, no 1, pp. 60–63.
5. Chwalisz K. (1997) Regulation of the uterus and cervix during pregnancy and labor. Role of progesterone and nitric oxide in the uterus: endometrium and myometrium. *New York: Academy of Sciences*, pp. 238–253.
6. Chwalisz K. (1994) The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as adjunct to labor and delivery. *Human reproduction*, no 9, pp. 131–161.
7. Baimbetova SH. (2004) *Diagnosticheskaya i prognosticheskaya rol' ionizirovannogo kal'tsiya pri bystrykh rodakh* [Diagnostic and prognostic role of ionized calcium in fast labor] (PhD Thesis), Almaty, 21 p.
8. Kuz'minykh T. (2019) Rol' biologicheskii aktivnykh molekul v razvitii sokratitel'noy deyatel'nosti матки [The role of biologically active molecules in the development of contractile activity of the uterus]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*, vol. 68, no 1, pp. 21–27.
9. Simoncini T. (2006) *Fertility and sterility*, vol. 86, no 3, pp. 1235–1242.
10. Bulbul I. (2007) The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology*, vol. 68, no 8, pp. 1156–1168.
11. Buxton I. (2001) NO-induced relaxation of laboring and non-laboring human myometrium is not mediated by cyclic GMR? *Pharmacol*, vol. 134, no 1, pp. 206–214.
12. Kamyshnikov V. (2009) *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike. 3-ye izd.* [Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics]. M.: MEDpressinform, 896 p.

13. Veres I. (2018) Issledovaniye faktorov riska i razrabotka prognozirovaniya voznikoveniya gipotonicheskogo i infektsionnogo poslerodovogo endometrita [Research of risk factors and development of prediction of the occurrence of hypotonic and infectious postpartum endometritis]. *Voyennaya meditsina*, vol. 4, pp. 51–55.
14. Vladimirov YU. (2000) Svobodnyye radikaly v biologicheskikh sistemakh [Free radicals in biological systems]. *Sorovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, vol. 6, no 12, pp. 13–19.
15. Sosunov A. (2000) Oksid azota kak mezhkлетochnyy posrednik [Nitric oxide as an intercellular mediator]. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, vol. 6, no 12, pp. 27–34.
16. Malyshev I. (2000) Gipoksiya i oksid azota [Hypoxia and nitric oxide]. *Vestnik RAMN*, no 9, pp. 44–49.
17. Kamyshnikov V. (2018) Differentsiatsiya sostoyaniy «norma-patologiya». Metodologiya ustanovleniya referentnykh velichin, diagnosticheskoy i predskazatel'noy informativnosti pokazateley laboratornykh testov: printsipy otsenki [Differentiation of the states "norm-pathology". The methodology of determination of reference values, diagnostic and predictive informative value of laboratory test indicators: principles of assessment]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Yevropa*, vol. 7, no 1, pp. 9–24.
18. Zakharova V. (2011) *Effektivnost' medikamentoznykh metodov podgotovki k rodam pri patologicheskom preliminarnom periode* [The effectiveness of drug methods of preparation for childbirth in the pathological preliminary period] (PhD Thesis), Saint Petersburg, 28 p.
19. Podteteney A. (2003) *Prognozirovaniye, profilaktika i lecheniye slabosti i diskoordinatsii rodovoy deyatelnosti* [Prediction, prevention and treatment of weakness and discoordination of labor] (PhD Thesis), Moscow, 45 p.

Поступила/Received: 16.10.2019
Контакты/Contacts: veres.irochka@mail.ru

Яковлев-Малых Н.Н.¹, Камышников В.С.¹, Борисенко Т.Д.²

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

² 1-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Yakovlev-Malykh N.¹, Kamyshnikov V.¹, Borisenko T.²

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² 1st Municipal Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Сравнительная оценка выраженности процессов кардионекроза, протеолиза и фосфолиполиза при острых формах ишемической болезни сердца: значимость определения ассоциированного с беременностью белка плазмы-А и общей активности фосфолипазы как тестов прогнозирования неблагоприятных исходов формирования острого коронарного синдрома

Comparative Assessment of the Severity of Processes of Cardionecrosis, Proteolysis and Phospholipolysis in Acute Forms of Coronary Heart Disease: the Importance of Determination of the Pregnancy-Associated Plasma Protein-A and the Total Activity of Phospholipase as Tests for Prediction of Adverse Outcomes of Formation of Acute Coronary Syndrome

Резюме

Введение. Статья посвящена поиску новых объективных критериев прогнозирования неблагоприятных исходов прогрессирующего развития проявлений сердечно-сосудистой патологии при остром коронарном синдроме (ОКС). Полученные в ходе выполненного исследования научные данные служат обоснованием целесообразности использования тестов определения общей активности фосфолипазы A_2 (общ. ФЛА₂) и ассоциированного с беременностью белка (РАРР-А) сыворотки крови как маркеров-предикторов дестабилизации атеросклеротических бляшек, осложняющей течение ишемической болезни сердца.

Цель. Сравнительная оценка выраженности процессов некролиза, протеолиза и фосфолиполиза по показателям определения уровня высокочувствительного тропонина I (вч ТрI), ассоциированного с беременностью плазменного белка А (РАРР-А) и общей активности

фосфолипазы A_2 (общ. ФЛА₂) сыворотки крови у пациентов с атеросклеротической болезнью сердца, нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда.

Материалы и методы. Обследовано 100 пациентов с острыми формами ИБС и 50 практически здоровых человек, составивших контрольную группу.

Всем пациентам произведено количественное определение содержания «высокочувствительного тропонина I» (методом хемилюминесцентного иммунологического анализа), общей активности фосфолипазы A_2 (инновационным методом, основанном на детекции превращения метгемоглобина в гемихром) с применением наборов реагентов УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» и концентрации PAPP-A в сыворотке крови (иммунохимическим методом с электрохемилюминесцентной детекцией – ECLIA (PAPP-A «Roche») на иммунохимическом анализаторе «Cobas e411»).

Результаты и обсуждение. Показано, что по мере усугубления тяжести сердечно-сосудистой патологии в ряду острых форм ИБС (атеросклеротическая болезнь сердца → нестабильная стенокардия → инфаркт миокарда) происходит последовательное, притом многократное, увеличение уровней содержания в сыворотке крови PAPP-A и общ. ФЛА₂.

Такая динамика изменения показателей лабораторных тестов может служить основанием для осуществления тактики ведения пациентов с нестабильной стенокардией, направленной на предотвращение возможного разрыва атеросклеротической бляшки и последующей тромбоэмболии вследствие проявления PAPP-A протеолитической, а ФЛА₂ – фосфолипазной активности, сочетанное влияние которых не может не привести к дестабилизации оболочки атеросклеротической бляшки.

Заключение. Комплексный подход к клинико-лабораторной диагностике осложненных форм ИБС, состоящий в использовании наряду с маркерами кардионекроза лабораторных тестов, отражающих проявления протеолиза (PAPP-A) и фосфолиполиза (общ. ФЛА₂), позволяет предвидеть возникновение неблагоприятных исходов у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, а выбранные для исследования новые биохимические кардиомаркеры (PAPP-A и общ. ФЛА₂) можно рассматривать в качестве предикторов ишемии и воспаления в коронарных сосудах, не зависящих от уровня высокочувствительного тропонина I в сыворотке крови пациентов.

Ключевые слова: острые формы ишемической болезни сердца, атеросклеротическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, высокочувствительный тропонин I, общ. фосфолипаза A_2 , ассоциированный с беременностью белок плазмы-A, маркер-предиктор.

Abstract

Introduction. The article is devoted to the search for new objective criteria for prediction of adverse outcomes of the progressive development of manifestations of cardiovascular disease in acute coronary syndrome (ACS). The scientific data obtained in the course of the study justify the appropriateness of using tests to determine the total activity of phospholipase A_2 (total FLA₂) and the pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) as marker predictors of destabilization of atherosclerotic plaque complicating the course of coronary heart disease.

Purpose. A comparative assessment of the severity of the processes of necrobiosis, proteolysis and phospholipolysis in terms of determination of the level of highly sensitive troponin I (hsTr I), pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A), and the total activity of serum phospholipase A_2 (total FLA₂) in patients with atherosclerotic heart disease, unstable angina, and acute myocardial infarction.

Materials and methods. We examined 100 patients with acute forms of coronary heart disease and 50 practically healthy people, who made up the control group.

All patients underwent quantitative determination of the content of highly sensitive Troponin I (with chemiluminescent immunological analysis), total activity of phospholipase A_2 (innovative

method based on detection of methemoglobin to hemichrome conversion), and the concentration of PAPP-A in blood serum with the help of immunochemical method with electrochemiluminescent detection – ECLIA (PAPP-A "Roche") on immunochemistry analyser "Cobas e411".

Results and discussion. It was showed that as the severity of cardiovascular pathology worsens in the series of acute forms of coronary heart disease (atherosclerotic heart disease → unstable angina pectoris → myocardial infarction), a sequential, moreover, multiple increase of serum levels of PAPP-A and total FLA2 occurs.

Such dynamics of laboratory test indicators may serve as the base for implementation of the tactics for management of patients with unstable angina, aimed at prevention of possible rupture of atherosclerotic plaque and subsequent thromboembolism due to the manifestation of PAPP-A proteolytic activity and PLA2 phospholipase activity, the combined effect of which cannot but lead to destabilization of atherosclerotic plaque.

Conclusion. An integrated approach to the clinical and laboratory diagnostics of complicated forms of coronary heart disease, which includes the use of laboratory tests along with cardiac necrosis markers that reflect the manifestations of proteolysis (PAPP-A) and phospholipolysis (total FLA2) let to predict the occurrence of adverse outcomes in patients with diseases of the cardiovascular system. New biochemical cardiomarkers (PAPP-A and general FLA2) selected for research can be considered as predictors of ischemia and inflammation in coronary vessels, independent of the level of high sensitivity Troponin I in serum of patients.

Keywords: acute forms of coronary heart disease, atherosclerotic heart disease, unstable angina, myocardial infarction, highly sensitive troponin I, total phospholipase A2, pregnancy-associated plasma protein-A, predictor marker.

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений исследований в области кардиологии является поиск объективных критериев прогнозирования неблагоприятных исходов прогрессирующего развития проявлений сердечно-сосудистой патологии при остром коронарном синдроме (ОКС). Ряд авторов придерживается мнения о целесообразности использования в дополнение к широко применяемому в настоящее время маркерам некроза миокарда ряда других, отражающих иную природу патофизиологических процессов, «разыгрывающихся» в коронарных сосудах в преддверии наступления инфаркта миокарда. Несмотря на это, основная информация, касающаяся диагностики ОКС, продолжает оставаться связанной с применением новых, более чувствительных и специфичных, чем ранее известные, тестов выявления некробиотических процессов в миокарде.

Тем не менее к настоящему времени предложено много других тестов диагностики острых форм ишемической болезни сердца (оФИБС), состоящих в оценке эндотелиальной дисфункции, в том числе по уровню содержания в сыворотке крови оксида азота (NO), супероксиддисмутазы (СОД) [1–2], асимметричного диметиларгинина (ADMA) [3]. Обсуждается также роль иммунновоспалительного механизма в развитии атеросклероза, некоторыми исследователями активно изучаются вопросы патогенетического и клинического значения процесса неоангиогенеза [4–5]. К настоящему времени накоплено множество научных данных, подтверждающих важную роль воспалительных процессов как при формировании, так и при повреждении атеросклеротической бляшки

с последующей тромботической окклюзией и развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Продолжается поиск новых биохимических маркеров, отражающих нестабильность атеросклеротической бляшки. В их числе тесты определения высокочувствительного С-реактивного белка (hs-СРБ), предшественника предсердного натрийуретического пептида (NT-proBNP), про- и противовоспалительные цитокины. Среди наиболее известных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 и др.) особое внимание уделяется фактору некроза опухолей (TNF- α) [6–7]: выявлена статистически значимая прямая корреляция между концентрацией цитокинов ИЛ-6 и TNF- α и высоким риском развития инфаркта миокарда (ИМ). Многочисленным провоспалительным цитокинам противопоставит система защиты эндотелия, которая представлена в том числе и оксидом азота и противовоспалительными цитокинами: ИЛ-4, ИЛ-10. Показано, что стабильное течение атеросклероза сопровождается увеличенным уровнем противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10.

Представляется актуальным использование параметров оценки протеолитической активности ферментов для определения степени риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (как показателя нестабильности атеросклеротической бляшки) при ИБС. Одним из их представителей является фермент – нейтрофильная эластаза (НЭ). Его активность регулируется тканевыми ингибиторами протеиназ, в частности α 1-антитрипсином – белком острой фазы воспаления. Он ингибирует НЭ, предотвращая тем самым избыточное повреждение тканей в органах-мишенях при воспалении.

В последние годы показано, что выраженной протеолитической активностью у взрослых обладает ассоциированный с беременностью белок плазмы-А (РАРР-А). Клинические исследования продемонстрировали успешное применение теста определения ассоциированного с беременностью протеина плазмы-А в качестве потенциального биомаркера дестабилизированной (готовой к разрыву) атеросклеротической бляшки. Показано, что определение содержания РАРР-А способствует выявлению пациентов с высоким риском развития ОКС еще до развития клинических симптомов [8].

Повышенный уровень РАРР-А в плазме крови, отражая нестабильность атеросклеротических бляшек, может быть предиктором повреждения, потенциальным биомаркером нестабильности атеросклеротической бляшки, а следовательно – специфическим маркером ОКС.

Известно, что в периоде дестабилизации атеросклеротической бляшки (АСБ) стимулируется не только протеолитическая, но и фосфолипазная активность, способная вызывать деструкцию оболочек клеток и разрушать белки межклеточного матрикса, что приводит к истончению фиброзной «покрышки» атеросклеротической бляшки с последующим ее разрывом.

Перспективным диагностическим тестом для выявления сосудистого воспаления и «уязвимой» АСБ является липопротеин-ассоциированная фосфолипаза- A_2 – Lp-PLA $_2$ [9]. Полагают, что тест определения активности фосфолипазы A_2 оказывается в 100 раз более чувствительным в отношении детекции воспалительного процесса в стенках коронарных (артериальных) сосудов сердца, чем тест определения

высокочувствительного СРБ. Большое количество фермента сосредоточено в детрите атеросклеротической бляшки. При воздействии фосфолипазы A_2 на фосфолипиды мембран клеток образуется лизофосфатидилхолин (детергент, нарушающий физико-химические свойства мембран и рассматриваемый к тому же как фактор воспаления) и полиненасыщенная (арахидоновая) кислота, преобразующаяся в клетке в биологически активные продукты (простагландин, простагландин), существенно нарушающие метаболизм клеток. Этот процесс усугубляется еще и тем, что вследствие повышения микровязкости липидной фазы мембран изменяется чувствительность рецепторов клетки к влиянию гормонов белковой природы.

Отмечено, что повышенный уровень активности фосфолипазы A_2 (Lp-PLA₂) в плазме крови ассоциируется с риском возникновения осложненных форм ИБС.

Выполненное нами лабораторно-диагностическое исследование базируется на представлении о патогенетической значимости сочетанного деструктивного влияния на мембранные структуры клеток и оболочек атеросклеротических бляшек систем протео- и фосфолиполиза, результатом которого может быть дестабилизация атеросклеротических бляшек у пациентов с острыми формами ИБС.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная оценка выраженности процессов некробиоза, протеолиза и фосфолиполиза по показателям определения уровня высокочувствительного тропонина I (вчТр I), ассоциированного с беременностью плазменного белка А (РАРР-А) и общей активности фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) сыворотки крови у пациентов с атеросклеротической болезнью сердца, нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовало 100 пациентов, госпитализированных в кардиологические отделения 1-й городской клинической больницы г. Минска с острыми формами ИБС (атеросклеротическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда) и 50 практически здоровых человек (40% мужчин и 60% женщин) среднего возраста – 37,6 года, составивших контрольную группу («Контроль»).

Контингент исследованных лиц включал в себя:

1. Группу пациентов с диагнозом «атеросклеротическая болезнь сердца» (АБС), которую составили 35 пациентов (52% мужчин и 48% женщин) в возрасте (среднем) 71 год.
2. Группу пациентов с диагнозом «нестабильная стенокардия» (НС), представленную 37 пациентами среднего возраста – 71 год (6% мужчин и 44% женщин).
3. Группу обследованных с диагнозом «инфаркт миокарда» (ИМ) из 28 пациентов (69% мужчин и 31% женщин), их средний возраст составил 66 лет.

Взятие крови у пациентов осуществлялось путем венепункции локтевой вены в объеме 5 мл при помощи вакуум-содержащих систем. Венозная кровь подвергалась центрифугированию при 1500 об/мин в течение 15 минут на общеклинической центрифуге при комнатной

температуре (18–20 °С) с целью получения сыворотки крови, которая в последующем отбиралась в ряд специальных одноразовых микропробирок типа «эппендорф» и хранилась в морозильной камере при температуре –20 °С. Клинико-лабораторные исследования с использованием сыворотки крови проводились в течение последующих нескольких суток.

Определение показателей лабораторных тестов осуществлялось с использованием сертифицированных, зарегистрированных Министерством здравоохранения Республики Беларусь наборов реагентов.

Количественное определение концентрации «высокочувствительного тропонина I» (вчТр1) осуществлялось методом хемилюминесцентного иммунологического анализа (CLEIA) на иммунохемилюминесцентном экспресс-анализаторе экспертного класса PATHFAST (LSI Medience Corporation, Япония).

Энзиматическую активность фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) сыворотки крови определяли с применением отечественных наборов реагентов, производимых на базе УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Детекция ферментативной активности осуществлялась гемопротеиновым методом, принцип которого состоит в превращении метгемоглобина в гемихром, что в последующем регистрируется спектрофотометрически. Для исследования использовалась нативная сыворотка крови с исключением на доаналитическом этапе ее предварительной термической обработки, рекомендуемой для исследования панкреатической фосфолипазы, что позволило судить об общей активности этого фермента.

Определение концентрации PAPP-A в сыворотке крови осуществлялось иммунохимическим методом с электрохемилюминесцентной детекцией – ECLIA (PAPP-A «Roche») на иммунохимическом анализаторе «Cobas e411» с использованием наборов реагентов фирмы Roche Diagnostics, Швейцария. Преимущества используемой технологии («сэндвич»-метод) состояли в высокой аналитической чувствительности метода анализа, широком диапазоне измерения при использовании весьма небольшого объема биологической жидкости, притом в течение короткого промежутка времени аналитического исследования. Тест определения уровня PAPP-A у взрослых был использован в связи с представлением о том, что данный белок способен проявлять протеолитическую активность, выступая в качестве протеазы.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании лиц, составивших контрольную группу, установлено, что показатели фосфолиполиза по результатам определения общей активности ФЛА₂ ($2,15 \pm 0,32$ МЕ/л), а также протеолиза, оцененного по уровню PAPP-A ($5,74 \pm 1,94$ мМЕ/л), не выходили за пределы референтных значений.

Результаты исследования пациентов с атеросклеротической болезнью сердца, нестабильной стенокардией, инфарктом миокарда и у представителей группы «Контроль» приведены в таблице.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что при форме патологии «атеросклеротическая болезнь сердца» на фоне увеличенных показателей общей активности фосфолипазы A_2 и уровня PAPP-A концентрация тропонина I в сыворотке крови остается в пределах нормальных

Сравнительная оценка выраженности процессов кардионекроза, протеолиза и фосфолиполиза при острых формах ишемической болезни сердца: значимость определения ассоциированного с беременностью белка плазмы-А и общей активности фосфолипазы как тестов прогнозирования неблагоприятных исходов формирования острого коронарного синдрома

Показатели кардионекроза, протео- и фосфолиполиза (X+S_x) у пациентов с острыми формами ишемической болезни сердца и у представителей контрольной группы (практически здоровых лиц)

Биомаркеры	Атеросклеротическая болезнь сердца	Нестабильная стенокардия	Инфаркт миокарда	Контроль
Общ. ФЛА ₂	3,6±2,07 МЕ/л	4,45±2,93 МЕ/л	7,13±6,53 МЕ/л	2,15±0,32 МЕ/л
РАРР-А «Roche»	8,0±5,0 мМЕ/л	15,05±10,31 мМЕ/л	39,55±20,41 мМЕ/л	5,74±1,94 мМЕ/л
Тропонин I PATHFAST сTnl	6,64±5,1 нг/л	8,31±5,57 нг/л	88,14±77,41 нг/л	-//-*

Примечание: * так как в группу «Контроль» входили практически здоровые люди, концентрация вчТр I не производилась.

величин. Так, общая энзиматическая активность ФЛА₂ увеличивается в 1,67 раза, уровень РАРР-А – в 1,4 раза, тогда как концентрация высокочувствительного тропонина I (вчТр I) остается в пределах «нормальных» величин.

У пациентов с установленным диагнозом «нестабильная стенокардия» имеет место более выраженное увеличение показателей всех исследуемых анализов, однако при этом уровень высокочувствительного вчТр I все еще не выходил за пределы контрольных значений, оставаясь в «пограничной» области нормы.

Концентрация РАРР-А сыворотки крови у пациентов с нестабильной стенокардией возросла в 2,62 раза по сравнению с уровнем содержания этого белка в группе «Контроль», а по сравнению с уровнем этого специфического белка в группе пациентов с верифицированным диагнозом «атеросклеротическая болезнь сердца» – в 1,88 раза. Содержание вчТр I не выходило за пределы «нормы», хотя и был отмечен незначительный его подъем в сравнении с таковыми в первой группе исследованных лиц – 6,64 нг/л и 8,31 нг/л (увеличение составило 1,25 раза) соответственно.

У пациентов с верифицированным диагнозом «инфаркт миокарда» (по МКБ-10 код I21) отмечено увеличение показателей всех лабораторных тестов. Уровень вчТр оказался возросшим многократно – в 8,81 раза по сравнению со средним показателем нормы (что свидетельствует об обширном некробиотическом поражении сердечной мышцы и гибели кардиомиоцитов); показатели же протео- и фосфолиполиза отражают в основном иные патофизиологические процессы, способствующие разрыву оболочки атеросклеротической бляшки и тромбоземболии.

При этом содержание РАРР-А возрастает наиболее значительно – в 6,7 раза, а общая активность ФЛА₂ – в 3,32 раза.

Увеличение общей активности ФЛА₂ и концентрации РАРР-А у пациентов с ИМ отражает формирование условий, способствующих выраженной деструкции морфологических образований в коронарных сосудах при атеросклеротической болезни сердца (АСБ).

Как следует из рисунка, по мере усугубления тяжести сердечно-сосудистой патологии (в ряду острых форм ИБС (АКС → НС → ИМ)) происходит последовательное многократное увеличение уровней содержания в сыворотке крови РАРР-А и активности ФЛА₂.

В ходе выполненного исследования получены новые данные о возможной природе патофизиологических процессов, лежащих в основе

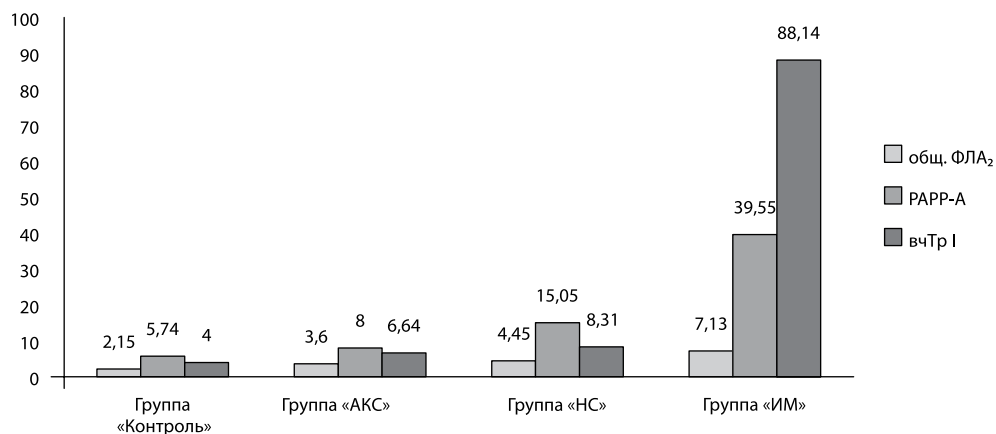


Диаграмма показателей фосфолипидиза, протеолиза и кардионекроза у пациентов с оФИБС

усугубления тяжести коронарной патологии. Если у пациентов первой группы (с атеросклеротической болезнью сердца), характеризующихся хроническим, латентным течением основного заболевания, уровень вчТр I остается в пределах референтных значений, то при этом использованные нами маркеры развития патологического процесса, отражающие выраженность фосфолипидиза и протеолиза, а именно уровни активности общей фосфолипазы А₂ и содержания PAPP-A, уже оказываются повышенными.

Во второй группе исследуемых – группе пациентов с верифицированным диагнозом «нестабильная стенокардия» (НС), представляющей собой своеобразное «пограничное» состояние, которое может повлечь за собой развитие неблагоприятных последствий ИБС, общая активность ФЛА₂ и протеолитический эффект PAPP-A превышают нормальные величины в 1,67 и 1,4 раза соответственно; при низкой концентрации вчТр I (не выходящей за пределы нормы). Такое сочетание показателей лабораторных тестов должно ориентировать на выбор адекватной тактики ведения пациентов с нестабильной стенокардией, нацеленной на предотвращение возможного разрыва атеросклеротической бляшки и последующей тромбоэмболии.

В ходе осуществленного исследования получены данные об особенностях изменения показателей, отражающих состояние кардионекроза, протеолиза и фосфолипидиза при разных формах ИБС. Если в группе пациентов с атеросклеротической болезнью сердца уровень вчТр I не выходил за пределы референтных значений, то показатели фосфолипидиза (общей активности ФЛА₂) и протеолиза (PAPP-A) уже были незначительно повышены.

Особое внимание привлекают результаты, полученные при исследовании пациентов с верифицированным диагнозом «нестабильная стенокардия», так как именно нестабильная стенокардия является «пограничным» состоянием перед возможностью к развитию неблагоприятных последствий ИБС. Обнаруженные при исследовании пациентов

с нестабильной стенокардией метаболические изменения должны насторожить врача-клинициста в отношении возможности осложненного течения ИБС и ориентировать его на выбор соответствующей тактики ведения пациентов с нестабильной стенокардией.

Констатация еще более выраженных изменений в активности ФЛА₂ и содержании PAPP-A у пациентов с инфарктом миокарда позволяет полагать, что сочетанное влияние процессов протеолиза и фосфолиполиза, обуславливающее развитие воспалительных процессов в стенках артерий и дестабилизацию оболочки атеросклеротических бляшек, может являться дополнительным существенным фактором, приводящим в конечном итоге к развитию инфаркта миокарда.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный подход к клинико-лабораторной диагностике осложненных форм ИБС, состоящий в использовании наряду с маркерами кардионекроза лабораторных тестов, отражающих проявления протеолиза (PAPP-A) и фосфолиполиза (ФЛА₂), позволяет предвидеть возникновение неблагоприятных исходов у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, а выбранные для исследования новые биохимические кардиомаркеры (PAPP-A и ФЛА₂) можно рассматривать в качестве предикторов ишемии и воспаления в коронарных сосудах, не зависящих от уровня высокочувствительного тропонина I в сыворотке крови пациентов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Luscher T.F., Tschudi M.R., Wenzel R.R., Noll G. (1997) Endotheliale dysfunction und stickstoffmonoxid (NO; Nitric Oxide). *Internist*, vol. 38, pp. 411–419.
2. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, vol. 43, pp. 109–142.
3. Petrishhev N.N., Vasina L.V., Vlasov T.D. (2007) Tipovy'e formy' disfunkcii e'ndotelija [Typical forms of endothelial dysfunction]. *Kliniko-laboratorny'j konsilium*, no 18, pp. 31–36.
4. Shevchenko A., E'l'-Bustani S. (2007) Placentarny'j faktor rosta – marker neoarteriogeneza u bol'ny'x IBS [Placental growth factor is a marker of neoarteriogenesis in patients with ischemic heart disease]. *Laboratoriya*, no 4, pp. 3–5.
5. Iwama H., Uemura S., Naya N. (2006) Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.*, vol. 47(8), pp. 1559–1567.
6. Bogova O., Chukaeva I. (2003) Infarkt miokarda. Vospalenie i prognoz [Myocardial infarction. Inflammation and prognosis]. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*, no 4, pp. 95–98.
7. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, vol. 91, pp. 2488–2496.
8. Kamy'shnikov V., Yakovlev-Maly'x N. (2017) Associoiranny'j s beremennost'yu protein-A plazmy' – novy'j biomarker destabilizacii ateroskleroticheskoy blyashki, prediktor oslozhnennogo techeniya ostrogo koronarnogo sindroma [Pregnancy-associated protein-A of plasma is a new biomarker of destabilization of atherosclerotic plaque, predictor of complicated course of acute coronary syndrome]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, vol. 6, no 2, pp. 184–195.
9. Kamy'shnikov V., Litvinko N., Pextereva N., Yakovlev-Maly'x N., Yuraga T. (2017) Lipoprotein-associoirannaya i sekretornaya fosfolipazy' A2: osobennosti metabolicheskogo vliyaniya i klinicheskaya znachimost' issledovaniya [Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A2: features of metabolic influence and clinical significance of research]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, vol. 6, no 2, pp. 186–195.

УДК 578.2

Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Лапо Т.П.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь

Sivets N., Shmeleva N., Lapo T.

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Новые возможности дифференциальной диагностики острых респираторных вирусных заболеваний на основе использования разработанных в Республике Беларусь технологий молекулярно-биологического исследования

New Opportunities for Differential Diagnostics of Acute Respiratory Viral Diseases on the Base of the Use of Molecular Biological Research Technologies Developed in the Republic of Belarus

Резюме

Цель. Разработать наборы реагентов для выявления основных возбудителей респираторных вирусных инфекций человека: вируса гриппа А и гриппа В, субтипов вируса гриппа А (H3N2, H1N1pdm09), вируса парагриппа 1–4-го типов, респираторно-синцициального вируса, риновируса, метапневмовируса, респираторного аденовируса, бокапарвовируса и коронавирусов 229E, NL63, HKU1, BetaCoV1.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы вирусов гриппа А и гриппа В, панель нуклеиновых кислот негриппозных респираторных возбудителей (FR-674) (СДС, Атланта, США), наборы реагентов «Рибо-сорб», «РЕБЕПТА-L», Gene JET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific Clone JET PCR Cloning Kit, Roti® – Transform; оборудование – термостат ТС-1/80СПУ, спектрофотометр IMPLEN P330, амплификатор Rotor Gene 6000, орбитальный шейкер PSU-10i. В рамках исследования применялись биотехнологические, молекулярно-генетические методы на основе программ Олиго Кальк, MEGA 6.

Результаты и обсуждение. В основе данной разработки лежит TaqMan-технология в мультиплексном формате и использование эндогенного внутреннего контроля (гены «домашнего хозяйства»), в качестве положительных контролей разработаны генно-инженерные конструкции на основе вектора JET1.2/blunt. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Для оценки аналитической чувствительности работы праймеров применяли такие параметры, как разница значения Ct (ΔCt), параметры стандартной кривой R^2 , уровень наклона логарифмической кривой (M) и эффективность реакции (E), которую рассчитывали по формуле $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Значение ΔCt в наших исследованиях варьировало от 3,2 до 3,4.

Аналитическая чувствительность метода исследования, реализуемого с применением разработанных наборов реагентов, составила 1×10^3 Гз/мл.

Аналитическую специфичность разработанных праймеров определяли путем реакции амплификации с использованием панели нуклеиновых кислот негриппозных вирусов (FR-674, СДС, Атланта, США). В качестве отрицательного контроля использовали ТЕ-буфер и воду для ПЦР. Аналитическая специфичность составила 98%.

Заключение. В рамках данного исследования разработаны наборы реагентов «ФЛУ-ген», «ОРВИ-ген», «КОРОНА-ген». Успешно проведены клинические испытания наборов и процедура государственной регистрации. Получены регистрационные удостоверения для разработанных наборов: № ИМ-7.103158, № ИМ-7.103157, № ИМ-7107619.

Ключевые слова: респираторные вирусы, ПЦР, аналитическая чувствительность и специфичность, эффективность реакции.

Abstract

Purpose. To develop reagent kits for identification of the main causative agents of human respiratory viral infections: influenza A virus and influenza B virus, influenza A virus subtypes (H3N2, H1N1pdm09), parainfluenza virus type 1–4, respiratory syncytial virus, rhinovirus, metapneumovirus, respiratory, bocaparvovirus, and coronaviruses 229E, NL63, HKU1, BetaCoV1.

Materials and methods. We used the strains of influenza A and influenza B viruses, a panel of nucleic acids of non-influenza respiratory pathogens (FR-674) (SDS, Atlanta, USA), reagent kits "Ribot-sorb", "REVERTA-L", Gene JET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific Clone JET PCR Cloning Kit, Roti® – Transform, equipment – TC-1 / 80SPU thermostat, IMPLEN P330 spectrophotometer, Rotor Gene 6000 amplifier, PSU-10i orbital shaker. As part of the study, there were used biotechnological, molecular genetic methods based on the Oligo Kalk, MEGA 6 programs.

Results and discussion. This development is based on TaqMan technology in a multiplex format and the use of endogenous internal control ("housekeeping" genes). Genetic engineering constructs based on the JET1.2 / blunt vector were developed as a positive control. The volume of the reaction mixture was 25 μ l. To assess the analytical sensitivity of the primers, the following parameters were used: difference of the Ct value (Δ Ct), parameters of the standard curve R2, the slope of the logarithmic curve (M), and effectiveness of reaction (E), which was calculated by the formula $E = 10^{(-1 / \text{slope})} - 1$. The Δ Ct value in our studies ranged from 3.2 to 3.4.

The analytical sensitivity of the research method implemented using the developed sets of reagents, was 1×10^3 Ge/ml.

The analytical specificity of the designed primers was determined with the amplification reaction using a panel of nucleic acids of non-influenza viruses (FR-674, SDS, Atlanta, USA). TE buffer and PCR water were used as a negative control. Analytical specificity was 98%.

Conclusion. In the framework of this study, the reagent kits "FLU-gene", "ARVI-gene", "CORONA-gene" were developed. The clinical trials of the kits and the state registration procedure were successfully conducted. The following registration certificates were obtained for the developed kits: No. IM-7.103158, No. IM-7.103157, No. IM-7107619.

Keywords: respiratory viruses, PCR, analytical sensitivity and specificity, effectiveness of reaction.

■ ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным литературы, на долю острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) приходится около 70% от общей инфекционной патологии человека. Воздушно-капельный путь передачи, тропность вирусов к тканям верхних и нижних отделов дыхательных

путей, повсеместное распространение и высокая контагиозность способствуют повышенной восприимчивости человека к данной группе возбудителей. Многие респираторные патогены после перенесенного заболевания способны персистировать в организме, периодически вызывая обострения хронических инфекций, и часто являются триггером бактериальной инфекции на фоне ОРВИ. Все острые респираторные инфекции имеют сходные клинические проявления, и с точностью идентифицировать возбудителя инфекции можно только при помощи лабораторных методов диагностики [1, 2]. Традиционные методы идентификации респираторных вирусов (изоляция и идентификация вируса, серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител в течение заболевания) имеют ряд недостатков, связанных с недостаточной чувствительностью, большой длительностью, трудоемкостью, и не всегда позволяют с высокой чувствительностью выявить в клинических образцах основные группы респираторных возбудителей. В настоящее время в качестве диагностического метода предпочтение отдается полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), в основе которого лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Количество матрицы искомого возбудителя измеряется после каждого цикла с помощью флуоресцентных красителей, которые дают увеличение флуоресцентного сигнала прямо пропорционально количеству молекул ДНК. Чем интенсивней флуоресценция, тем больше продуктов амплификации находится в образце. Достоинствами метода ПЦР-РВ являются высокая специфичность, чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, возможность выявления сразу нескольких патогенов в одной пробирке при условии наличия в реакционной смеси нескольких пар соответствующих праймеров (мультиплексная ПЦР), а также данный метод исследования позволяет относительно быстро получить результат обследования. Отличительной чертой ПЦР-РВ является не только возможность количественного определения ДНК/РНК возбудителей в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом значительно уменьшить риск получения ложноположительных результатов. ПЦР в реальном времени успешно применяется как в научных исследованиях, так и в качестве быстрой диагностики заболеваний, ассоциированных с респираторными возбудителями.

ПЦР-РВ представляет собой реакцию с 40–45 повторяющимися циклами. Различают три основные этапа для каждого повторяющегося цикла: денатурация – предназначена для перевода двуцепочечной молекулы ДНК в одноцепочечную в ходе нагревания реакционной смеси до 95 °С. На втором этапе происходит снижение температуры реакции до температуры, равной температуре плавления праймеров, и отжиг праймеров и зонда на комплементарные участки ДНК-матрицы. Элонгация является последним этапом реакции, где происходит достройка нуклеотидной последовательности с помощью ДНК-полимеразы. Температурный оптимум работы ДНК-полимеразы варьирует в пределах 70–74 °С [3, 4]. Существует множество разновидностей ПЦР-РВ, которые отличаются друг от друга по способам генерации репортерной флуоресценции.

Наиболее широкое применение в лабораторной диагностике получил метод с использованием TaqMan-зондов, который основан на 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют олигонуклеотид, меченный на 5'-конце флуоресцентным красителем, а на 3'-конце – фосфатной группой и гасителем флуоресценции. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

До настоящего времени в нашей стране для дифференциальной диагностики возбудителей ОРВИ использовались импортные реагенты, что значительно ограничивало диагностику заболеваний, ассоциированных с респираторными вирусами, в практическом здравоохранении. Разработка импортозамещающих медицинских изделий, в том числе реагентов для *in vitro* diagnostic (IVD) на основе метода ПЦР-РВ, позволила бы проводить дифференциальную диагностику возбудителей ОРВИ в практическом здравоохранении, значительно снизить назначение антибиотиков при вирусной инфекции и, следовательно, предупредить развитие антибиотикорезистентности.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать набор реагентов для качественного выявления основных возбудителей респираторных вирусных инфекций человека: вируса гриппа А (ВГА) и гриппа В (ВГВ), субтипов вируса гриппа А (H3N2, H1N1pdm09), вируса парагриппа 1–4-го типов (ПГ1–4) респираторно-синцициального вируса (РС), риновируса (РВ), метапневмовируса (МПВ), респираторного аденовируса (АД), бокапарвовируса (БВ) и коронавирусов (КВ) 229Е, NL63, HKU1, BetaCoV1 в клиническом материале человека с симптомами ОРВИ.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по разработке наборов реагентов для диагностики вируса гриппа и основных возбудителей ОРВИ выполнены в ходе научно-исследовательской работы (НИР) «Разработать набор для дифференциальной диагностики ОРВИ на основе метода ПЦР» в рамках Государственной научно-технической программы (ГНТП) «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» 2011–2015 гг. Исследования по разработке набора реагентов для диагностики коронавирусов 229Е, NL63, HKU1, BetaCoV1 выполнены в ходе НИР «Разработать и освоить технологию производства набора реагентов для выявления респираторных коронавирусов 229Е, NL63, OC43, HKU1 методом ПЦР в режиме реального времени» в рамках ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи» 2016–2020 гг.

В работе использовали штаммы вирусов гриппа А (А/Минск/42/09/ H1N1pdm09, А/Минск/108/09/H3N2) и гриппа В двух эволюционных линий (В/Минск/121/09, В/Солигорск/140/07), выделенные на территории страны и депонированные в специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; панель нуклеиновых кислот негриппозных респираторных возбудителей (FR-674) (СДС, Атланта, США), состоящую из 36 образцов вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот.

Подбор праймеров и зондов осуществляли на основании нуклеотидных последовательностей респираторных вирусов, представленных в Международном генетическом банке данных (GenBank). Оценку температуры плавления, расчет вероятности образования шпилек и димеров праймеров проводили с применением online-пакета Олиго Кальк (БГУ, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, Республика Беларусь), размещенного на сайте: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу MEGA 6. Разработанные праймеры и зонды были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Выделение ДНК/РНК, проведение реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием коммерческих наборов «Рибо-сорб», «РЕВЕРТА-L» производства «АмплиСенс» (Российская Федерация) согласно инструкции производителя. Постановку ПЦР в режиме реального времени осуществляли на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett research, Австралия). Наличие ПЦР-продукта необходимой длины контролировали электрофоретическим методом в 2%-ном агарозном геле с добавлением этидия бромид.

Очистку ампликонов из геля проводили набором реагентов GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Очищенный ПЦР-продукт использовали для клонирования и получения положительных контролей на основе вектора JET1.2/blunt, входящего в состав набора Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные генно-инженерные конструкции трансформировали в клетки *E. coli* линии DH5a, высевали на чашки Петри и инкубировали в течение ночи при 37 °С в термостате ТС-1/80СПУ (Российская Федерация). Накопление трансформированной *E. coli* проводили на орбитальном шейкере PSU-10i (BioSan, Латвийская Республика). Для приобретения компетентности *E. coli* DH5a использовали набор реагентов Roti® – Transform (Carl Roth, Германия). Оценку качества вставки продукта амплификации проводили методом ПЦР-РВ.

Определение концентрации плазмидной ДНК проводили с помощью спектрофотометра IMPLen P330 (Германия) путем измерения оптической плотности раствора нуклеиновых кислот при длине волны 260 и 280 нм. Для определения концентрации плазмидных конструкций готовили разведения 1:1000.

Для суждения о диагностической надежности лабораторных тестов использовали параметры оценки диагностической чувствительности (Se) $Se = TP / (TP + FN) \times 100\%$, диагностической специфичности (Sp) $Sp = TN / (TN + FP) \times 100\%$, прогностической ценности положительного результата теста (+PV) $+PV = TP / (TP + FP) \times 100\%$, прогностической ценности отрицательного результата теста (-PV) $-PV = TN / (FN + TN) \times 100\%$, где TP – истинно положительные результаты, TN – истинно отрицательные результаты, FP – ложноположительные результаты, FN – ложноотрицательные результаты.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результат исследований с использованием ПЦР-РВ (чувствительность, специфичность, выход продукта реакции) во многом определяется тем,



Рис. 1. Схематическое изображение TaqMan-зонда [6]

насколько правильно спроектированы праймеры и зонды. Праймеры и зонды – это искусственно синтезированные олигонуклеотиды размером от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные матрице гена-мишени. Зонд в своей конструкции содержит с 5'-конца флуорофор, с 3'-конца находится гаситель флуоресценции. Праймеры и зонды играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации, и их конструирование является одним из наиболее критических параметров успешного проведения ПЦР. Поэтому первым этапом нашего исследования стал анализ геномов респираторных вирусов и выбор наиболее консервативных участков для последующего моделирования праймеров и зондов. Для моделирования зондов использовали TaqMan-технологию. При моделировании учитывали такие факторы, как длина, специфичность, температура плавления и отжига праймеров, состав ГЦ нуклеотидов, отсутствие гомо- и гетеродимеризации. Олигонуклеотидные зонды моделировали с учетом проведения исследований в мультиплексном формате и использовали следующие флуорофоры: FAM (карбоксифлуоресцеин), ROX (Карбокси-X-родамин) и HEX (6-карбокси-гексахлор-флуоресцеин), а также гасители флуоресценции BHQ-1 (Black Hole Quencher-1) и BHQ-2 (Black Hole Quencher-2). Схематическое изображение TaqMan-зонда представлено на рис. 1.

Эффективность полимеразной цепной реакции зависит от качества забора материала для исследования и от качества выделения нуклеиновых кислот. В случае диагностики инфекций, вызываемых РНК-содержащими вирусами, результат ПЦР также зависит от качества проведения реакции обратной транскрипции. Поэтому возникает необходимость контролировать все этапы проведения ПЦР, начиная с этапа выделения, реакции обратной транскрипции и непосредственно хода амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этой цели используются внутренние контроли (экзогенные или эндогенные). Они представляют собой любой препарат ДНК, не схожий с ДНК искомого возбудителя. Экзогенный внутренний контроль добавляют на этапе обработки клинического материала и контролируют этап выделения ДНК/РНК. В качестве эндогенного внутреннего контроля используют гены «домашнего хозяйства» (от англ. housekeeping genes). Гены «домашнего хозяйства» – это гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, экспрессия которых находится практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне; они могут быть использованы в качестве эндогенного внутреннего контроля. Использование эндогенного контроля в реакционной смеси позволяет не только контролировать все этапы ПЦР, но и оценивать качество забора клинического материала. В качестве контролей нами использовались консервативный участок 18S

РНК человека (контроль РНК матриц) и участок митохондриальной ДНК человека (мтДНК) для контроля ДНК. Высокая специфичность метода позволяет проводить исследования в мультиплексном формате, где качество исследования напрямую зависит от выбора гена-мишени и аналитических характеристик, спроектированных праймеров и зондов. Анализ литературных данных позволил нам определить наиболее значимые для диагностики гены респираторных вирусов. На основании имеющихся в GenBank последовательностей была сформирована выборка целевых участков генов-мишеней респираторных вирусов и проведен статистический анализ ДНК, в основе которого лежали методы математической оценки сходства и различия анализируемых последовательностей. Для работы с последовательностями ДНК использовали специализированное программное обеспечение, позволяющее просматривать последовательности, сравнивать их, проводить разнообразные статистические расчеты. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу MEGA 6.0. Все праймеры и зонды проанализированы на наличие вторичной структуры, содержание G/C, возможность образования димеров и шпилек, также проанализированы с помощью компьютерной программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) на наличие неспецифической гомологии. Гомология разработанных праймеров и зондов с последовательностью анализируемых генов составила 100%. Аналитические характеристики спроектированных праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Аналитические характеристики разработанных праймеров и зондов

Вирусный агент	Ген-мишень	Длина ампликона, п. н.	Аналитические характеристики праймеров и зондов					флуор	гаситель флуоресценции
			название праймера	положение в геноме	состав GC, %	Tm плавления, °C			
BGA	M	117	F	145–165	43	55–57	FAM	BHQ1	
			R	243–262	45–50	56–58			
			P	212–231	70	67			
BGB	HA	109	F	1130–1152	39	59	HEX	BHQ1	
			R	1220–1239	50	58			
			P	1171–1195	44	67			
H3	HA	98	F	1089–1117	53	57	FAM	BHQ1	
			R	1169–1187	56	56			
			P	1152–1173	46	64			
N2	NA	108	F	357–378	41	58	ROX	BHQ2	
			R	445–465	43	57			
			P	388–416	45	69			
H1	HA	107	F	189–211	39	59	FAM	BHQ1	
			R	234–256	50	58			
			P	277–296	48	63			

Продолжение таблицы 1

Вирусный агент	Ген-мишень	Длина ампликона, п. н.	Аналитические характеристики праймеров и зондов					
			название праймера	положение в геноме	состав GC, %	Tm плавления, °C	флуор	гаситель флуоресценции
N1	NA	104	F	873–893	48	60	HEX	BHQ1
			R	956–977	45	60		
			P	907–931	53	67		
АД	Hexon	91	F	7–23	59–65	55–57	HEX	BHQ1
			R	82–98	65–71	57–60		
			P	52–73	55–64	64–68		
БВ	NP1	158	F	75–93	56	57	FAM	BHQ1
			R	214–233	50	58		
			P	98–117	70	67		
РС	F	94	F	1193–1215	43	61	FAM	BHQ1
			R	1261–1287	31	60		
			P	1230–1255	50	68		
МПВ	N	108	F	864–884	43–48	57–60	HEX	BHQ1
			R	952–972	48	60		
			P	904–931	43	57		
РВ	5' UTR	205	F	302–317	75–81	58–61	HEX	BHQ1
			R	487–507	48	60		
			P	390–412	61–65	68–70		
ПГ1	N	109	F	161–180	50	58	HEX	BHQ1
			R	248–270	39	59		
			P	212–235	54	67		
ПГ3	N	119	F	3–27	41	58	ROX	BHQ2
			R	58–80	56	56		
			P	101–122	43	67		
ПГ2	P	123	F	2570–2588	53	57	FAM	BHQ1
			R	2673–2693	43	57		
			P	2628–2848	67	67		
ПГ4	N	124	F	563–582	39–43	59–61	ROX	BHQ2
			R	691–708	53	57		
			P	558–584	44	64		
18SRNA	RNA	92	F	1554–1571	61	58	FAM ROX HEX	BHQ1 BHQ2 BHQ1
			R	1627–1646	50	58		
			P	1590–1613	54	67		
мтДНК	ДНК	91	F	16249–16266	61	58	FAM	BHQ1
			R	16320–16340	48	60		
			P	16271–16296	50	68		
KB 229E	N	95	F	346–365	50	58	HEX	BHQ1
			R	424–441	61	58		
			P	384–409	42	65		

Окончание таблицы 1

Вирусный агент	Ген-мишень	Длина ампликона, п. н.	Аналитические характеристики праймеров и зондов					
			название праймера	положение в геноме	состав GC, %	Tm плавления, °C	флуор	гаситель флуоресценции
KB HKU1	OFR1b	150	F	99–122	33	58	ROX	BHQ2
			R	169–194	33–38	53–55		
			P	229–249	42	65		
KB NL63	N	94	F	573–597	32	59	ROX	BHQ2
			R	646–667	41	58		
			P	607–632	42	65		
KB Beta-CoV1	N	93	F	775–797	39	59	HEX	BHQ1
			R	848–868	43	57		
			P	810–833	58	69		

После подбора праймеров следующим этапом разработки стала оптимизация условий амплификации (подбор соотношения концентраций прямого, обратного праймеров и зонда, состава смеси для ПЦР, режима амплификации). Оптимизацию условий амплификации проводили для реакционной смеси объемом 25 мкл. Эмпирическим путем для всех сконструированных праймеров и зондов в реакционной смеси было определено следующее соотношение: F, R – 400 нмоль/л, P – 100 нмоль/л, повышение концентрации праймеров и зондов в реакционной смеси приводило к образованию неспецифических продуктов реакции. В исследованиях использовали полимеразу Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США), которая обладает хорошо выраженной 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Состав реакционной смеси для ПЦР приведен в табл. 2.

С целью отработки оптимального режима амплификации рассматривали разные схемы проведения ПЦР. Как правило, программа ПЦР включает три температурных интервала: денатурацию молекул ДНК,

Таблица 2
Состав реакционной смеси для ПЦР

Реагент	Концентрация исходных растворов	Объем в расчете на одну реакцию, мкл	Конечные концентрации в реакции
ПЦР буфер (100 мМ Трис-НСI (рН 8,8), 500 мМ КСI, 0,8% (v/v) Nonidet P40)	10X	2,5	1X
Смесь DNTPs	10 мМ	0,5	2 мМ
MgCl ₂	50 мМ	1,5	3 мМ
Прямой праймер (F)	10 мМ	1,0	0,4 мМ
Обратный праймер (R)	10 мМ	1,0	0,4 мМ
Зонд (P)	10 мМ	0,25	0,1 мМ
ДНК матрица		10,0	10 мкг/мл
Таг ДНК-полимераза	5 ед/мкл	0,5	0,1 ед/мкл
Вода для ПЦР		7,75	

отжиг праймеров и синтез ДНК, повторяющиеся 20–50 раз. Этого достаточно для получения 25–50 мг/л ампликона с единичной исходной молекулы ДНК. Экспериментальным путем с использованием в качестве матрицы панель нуклеиновых кислот негриппозных респираторных возбудителей (FR-674, СДС, Атланта) нами был отработан оптимальный режим для проведения ПЦР, состоящий из следующих циклов: денатурация при 95 °С – 5 мин., отжиг праймеров при 58°С – 20 с., элонгация при 72 °С – 10 с. – 10 циклов без детекции, далее 35 циклов с детекцией по схеме: денатурация при 95 °С – 10 с., отжиг при 58 °С – 20 с., элонгация при 72 °С – 10 с. При использовании данного режима происходил максимальный отжиг и синтез ДНК, о чем свидетельствовал уровень флуоресценции и пороговый цикл (Ct) реакции. Длину и чистоту амплификации участков генома респираторных вирусов с разработанными праймерами оценивали с помощью гель-электрофореза. Электрофореограмма продуктов амплификации представлена на рис. 2.

Результаты, полученные в ходе гель-электрофореза, показали, что выбранный режим амплификации, состав реакционной смеси и соотношение праймеров и зондов позволяют получать ампликоны заданной длины. При проведении ПЦР-РВ не происходит димеризации праймеров и регистрируется накопление только специфического продукта амплификации для каждого гена-мишени. Для получения положительных контролей (ПКО) очищенные ПЦР-продукты клонировали в вектор JET1.2/blunt. Вектор содержит ген летального рестрикционного фермента, который разрушается путем лигирования вставки ДНК в сайт клонирования. В результате только бактериальные клетки с рекомбинантными плазмидами способны образовывать колонии. Трансформированные

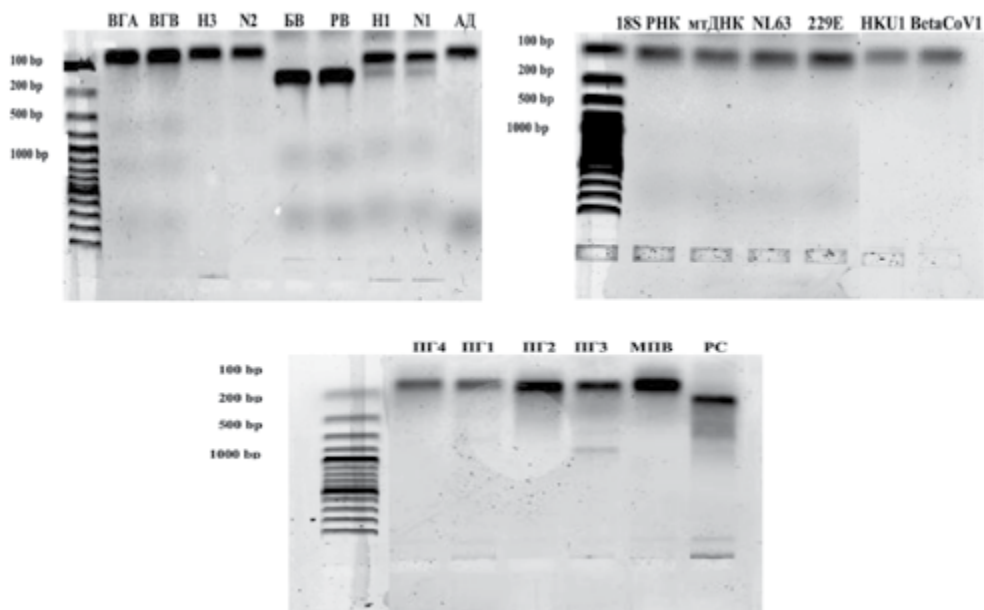


Рис. 2. Электрофореограмма продуктов амплификации

клетки *E. coli* линии DH5a высевали на чашки Петри. Скрининг клонов, несущих специфические вставки, проводили методом ПЦР в режиме реального времени. При проведении ПЦР наблюдали увеличения флуоресцентного сигнала на соответствующих каналах для всех рекомбинантных плазмид. Таким образом полученные рекомбинантные плазмиды pIFA/M/145-262, pIFB/HA/1130-1239, pIF/N3/1089-1187, pIF/N2/357-465, pIF/H1/189-256, pAD/HEX/7-98, pHBov1/NP1/75-233, pRS/F/1193-1287, pMPV/N/864-972, pRV/5UTR/302-507, pPIV1/N/161-270, pPIV3/N/3-122, pPIV2/P/2570-2693, pPIV4/N/563-708, p18SRNA/1544-1646, p/mtDNA/16249-16340, pCOV229E/N/346-441, pCOVHKU1/OFR1b/99-194, pCOVNL63/N/ 573-667 и pCOVBetaCoV1/N/775-868 могут быть использованы в качестве положительных контрольных образцов при проведении ПЦР-РВ с разработанными нами праймерами и зондами. Карта строения вектора и колонии клеток *E. coli* линии DH5a после трансформации приведена на рис. 3.

Показатели аналитической и диагностической чувствительности и специфичности являются основными характеристиками разрабатываемых диагностических препаратов на основе метода ПЦР. Одним из методов оценки аналитической чувствительности является оценка эффективности реакции. Параметры эффективности ПЦР показывают, насколько качественно происходит удвоение количества целевой ДНК на каждом цикле. Эффективность реакции свидетельствует о «пригодности» праймеров и зондов для проведения анализа. ПЦР с низкой эффективностью будет иметь низкую чувствительность, и, следовательно, такие реагенты не могут быть использованы для диагностики. Эффективность реакции в формате дуплекса (респираторный возбудитель/эндогенный внутренний контроль – РВ/ЭВК) и триплекса (два респираторных возбудителя/эндогенный внутренний контроль – ВГА/ВГВ/ЭВК, АД/БВ/ЭВК, РС/МПВ/ЭВК, ПГ1/ПГ3/ЭВК, ПГ2/ПГ4/ЭВК, НЗ/Н2/ЭВК, Н1/Н1/ЭВК KB229E/НКУ1/ЭВК, KBNL63/BetaCoV1/ЭВК) изучали с использованием панели стан-

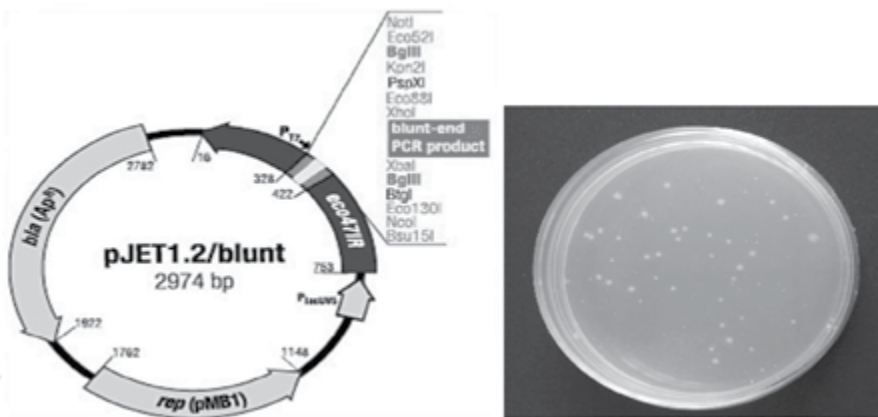


Рис. 3. Карта строения вектора pJET1.2/blunt и колонии клеток *E. coli* линии DH5a после трансформации

дартных образцов на основе полученных плазмидных конструкций pIFA/M/145-262, pIFB/HA/1130-1239, pIF/H3/1089-1187, pIF/N2/357-465, pIF/H1/189-256, pAD/HEX/7-98, pHBoV1/NP1/75-233, pRS/F/1193-1287, pMPV/N/864-972, pRV/5UTR/302-507, pPIV1/N/161-270, pPIV3/N/3-122, p/PIV2/P/2570-2693, pPIV4/N/563-708, p/18SRNA/1544-1646, p/mtDNA/16249-16340, pCOV229E/N/346-441, pCOVHKU1/OFR1b/99-194, pCOVNL63/N/ 573-667 и pCOVBetaCoV1/N/775-868. Для каждого стандартного образца с начальной концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл были приготовлены 10-кратные разведения в диапазоне концентраций от 1×10^5 до 1×10^2 ГЭ/мл. Каждую концентрацию стандартных образцов анализировали в трех повторах. Оценка эффективности реакции в мультиплексе проводили на основании программного обеспечения амплификатора, используя следующие параметры: разница значения Ct (ΔCt), параметры стандартной кривой R^2 , уровень наклона логарифмической кривой (M) и эффективность реакции (E), которую рассчитывали по формуле $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Пороговый цикл – это номер цикла, при котором флуоресцентный сигнал реакции пересекает порог, Ct используется для расчета начального числа копий ДНК и зависит от начального количества мишени, чем больше мишени, тем меньше значение Ct. По мере уменьшения количества матрицы число циклов, при котором наблюдается значительное усиление уровня флуоресценции, увеличивается. В серии 10-кратных разведений плазмидных конструкций ΔCt между разведениями должны составлять $\sim 3,3$ цикла. Это предполагает, что ПЦР протекает со 100% эффективностью, т. е. количество продукта идеально удваивается в течение каждого цикла. Коэффициент корреляции является мерой того, насколько хорошо данные соответствуют стандартной кривой. Значение R^2 отражает линейность стандартной кривой. В идеале значение R^2 равно 1, хотя значение R^2 равно 0,999, как правило, является максимальным значением. Эффективность реакции ПЦР должна составлять 100%, что означает удваивание матрицы после каждого цикла амплификации во время экспоненциального роста кривой амплификации. Приемлемые показатели эффективности реакции лежат в диапазоне от 90% до 110%, что соответствует значению угла наклона кривой амплификации от $-3,58$ до $-3,10$.

Данные оценки эффективности ПЦР-РВ в формате триплекс и дуплекс показали, что значение ΔCt варьировало от 3,2 до 3,4. При увеличении значения показателя ΔCt наблюдали снижение эффективности реакции амплификации до 96%, при снижении значения до 3,2 фиксировали увеличение эффективности реакции до 105%. Среднее значение эффективности реакции в наших исследованиях находилось в диапазоне 97,6–99,6%. В ходе оценки эффективности реакции с использованием 10-кратных разведений стандартных образцов в диапазоне концентраций от 1×10^5 до 1×10^2 ГЭ/мл была также оценена аналитическая чувствительность разработки. Аналитическая чувствительность представляет собой то минимальное количество генетического материала респираторного возбудителя, которое может быть определено данным методом. Минимальное надежно детектируемое количество ДНК/РНК в наших исследованиях составило 1×10^2 ГЭ/мл (100 копий в реакции). Пример стандартных кривых, использованных для анализа, приведен на рис. 4.

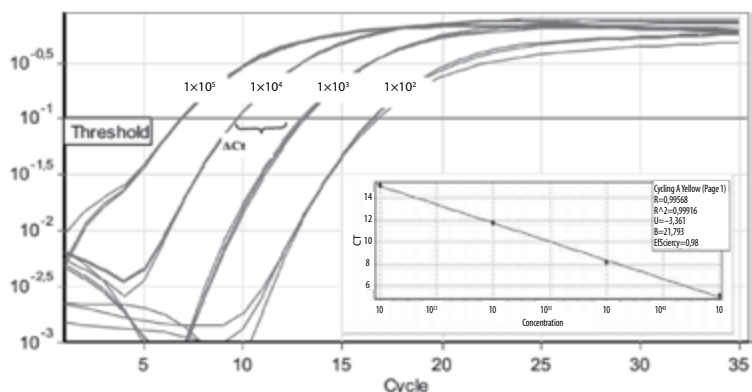


Рис. 4. Пример стандартных кривых, использованных для анализа

Статистические характеристики оценки эффективности ПЦР-РВ в формате мультиплекс приведены в табл. 3.

Диагностическую чувствительность разработки оценивали на 170 отрицательных и 170 положительных образцах, в которых был выявлен или не выявлен генетический материал исследуемых возбудителей, с помощью коммерческих тест-систем «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

Таблица 3
Статистические данные эффективности ПЦР-РВ в формате триплекс и дуплекс

Формат ПЦР	Вирус	Ср. значение Ct±s, CV%	Концентрация плазмид, ГЭ/мл				ΔCt	R ²	M	Е реакци, %
			1×10 ⁵	1×10 ⁴	1×10 ³	1×10 ²				
Триплекс	ВГА	Ct±s	6,9±0,07	9,7±0,02	13,0±0,11	16,6±0,14	3,2	0,998	3,24	99
		CV,%	0,96	0,21	0,81	0,83				
	ВГВ	Ct±s	9,1±0,13	12,6±0,07	15,8±0,07	19,1±0,36	3,3	0,999	3,28	102
		CV,%	1,39	0,56	0,42	1,90				
	18S РНК	Ct±s	8,8±0,1	12,0±0,06	15,5±0,08	19,0±0,04	3,4	0,999	3,40	97
		CV,%	1,15	0,51	0,50	0,23				
Триплекс	АД	Ct±s	5,1±0,02	8,2±0,04	11,7±0,03	15,1±0,04	3,3	0,999	3,36	98
		CV,%	0,41	0,53	0,27	0,28				
	БВ	Ct±s	4,8±0,06	7,7±0,04	11,2±0,12	14,4±0,19	3,2	0,999	3,25	103
		CV,%	1,15	0,46	1,03	1,32				
	мтДНК	Ct±s	7,6±0,20	11,2±0,04	14,1±0,35	17,7±0,14	3,3	0,995	3,37	98
		CV,%	0,82	0,35	1,15	0,28				
Триплекс	РС	Ct±s	4,9±0,04	7,2±0,03	10,9±0,13	14,7±0,4	3,3	0,997	3,32	100
		CV,%	0,82	0,35	1,15	0,28				
	МПВ	Ct±s	4,3±0,06	7,5±0,15	10,8±0,12	14,3±0,06	3,3	0,999	3,33	100
		CV,%	1,34	2,04	1,07	0,40				
	18S РНК	Ct±s	6,2±0,1	9,3±0,06	12,5±0	16,1±0,36	3,3	0,997	3,33	99
		CV,%	1,61	0,62	0	0,36				

Окончание таблицы 3

Формат ПЦР	Вирус	Ср. значение Ct±s, CV%	Концентрация плазмид, ГЭ/мл				ΔCt	R ²	M	Е реак-ции, %
			1×10 ⁵	1×10 ⁴	1×10 ³	1×10 ²				
Триплекс	ПГ1	Ct±s	15,7±0,29	18,9±0,06	22,2±0,15	26,0±0,06	3,3	0,998	3,45	98
		CV,%	1,84	0,31	0,69	0,22				
	ПГ3	Ct±s	6,6±0,1	10,0±0,06	13,6±0,06	17,4±0,12	3,4	0,999	3,41	99
		CV,%	1,52	0,58	1,42	0,66				
	18S РНК	Ct±s	8,8±0,12	12,0±0,06	15,5±0,12	19,0±0	3,4	0,999	3,40	97
		CV,%	1,31	0,48	0,74	0				
Триплекс	ПГ2	Ct±s	3,2±0,01	5,7±0,05	9,2±0,08	12,7±0,14	3,2	0,996	3,20	100
		CV,%	0,18	0,88	0,88	1,09				
	ПГ4	Ct±s	7,9±0,13	11,5±0,09	14,8±0,27	18,2±0,13	3,4	0,999	3,43	96
		CV,%	1,60	0,78	1,79	0,73				
	18S РНК	Ct±s	9,8±0,26	13,3±0,31	16,6±0,15	20,1±0,18	3,4	0,997	3,39	97
		CV,%	2,68	2,35	0,92	0,90				
Триплекс	Н1	Ct±s	10,0±0,09	13,5±0,03	16,7±0,02	20,0±0,09	3,3	0,999	3,32	100
		CV,%	0,95	0,26	0,12	0,45				
	N1	Ct±s	10,5±0,06	13,7±0,07	16,9±0,06	20,4±0,08	3,3	0,999	3,29	101
		CV,%	0,54	0,54	0,36	0,39				
	18S РНК	Ct±s	8,1±0,06	10,7±0,07	14,7±0,06	18,1±0,08	3,3	0,992	3,38	98
		CV,%	0,7	0,69	0,41	0,44				
Триплекс	Н3	Ct±s	7,3±0,18	10,5±0,11	13,6±0,19	16,9±0,05	3,2	0,998	3,19	99
		CV,%	2,42	1,03	1,36	0,27				
	N2	Ct±s	8,8±0,6	12,3±0,06	15,4±0,13	18,7±0,12	3,3	0,999	3,20	101
		CV,%	6,77	0,46	0,86	0,62				
	18S РНК	Ct±s	5,8±0,04	9,4±0,58	12,2±0,11	15,4±0,06	3,2	0,999	3,21	99
		CV,%	0,75	6,14	0,91	0,39				
Дуплекс	РВ	Ct±s	3,7±0,03	6,7±0,06	10,3±0,12	13,6±0,1	3,3	0,998	3,33	99
		CV,%	0,72	0,91	1,18	0,75				
	18S РНК	Ct±s	8,8±0,1	12,0±0,06	15,5±0,08	19,0±0,04	3,4	0,999	3,40	97
		CV,%	1,15	0,51	0,50	0,18				
Триплекс	KB229E	Ct±s	10,31±0,02	13,68±0,03	17,13±0,02	20,18±0,04	3,3	0,999	3,37	99
		CV,%	0,15	0,19	0,12	0,18				
	KBHKU1	Ct±s	6,13±0,02	9,61±0,05	12,62±0,09	15,95±0,07	3,3	0,999	3,30	100
		CV,%	0,33	0,52	0,74	0,46				
	18S РНК	Ct±s	6,61±0,02	9,83±0,04	13,24±0,06	16,46±0,03	3,3	0,999	3,29	99
		CV,%	0,32	0,36	0,42	0,16				
Триплекс	KBNL63	Ct±s	8,45±0,05	11,87±0,06	15,23±0,04	18,59±0,04	3,4	0,998	3,32	97
		CV,%	0,59	0,46	0,29	0,19				
	KBBetaCoV1	Ct±s	10,10±0,06	13,48±0,02	16,79±0,02	20,10±0,29	3,3	0,999	3,24	103
		CV,%	0,56	0,15	0,09	1,42				
	18S РНК	Ct±s	6,44±0,06	9,53±0,09	13,14±0,31	16,34±0,49	3,3	0,999	3,37	98
		CV,%	0,86	0,95	2,37	2,97				

Примечание: Ct – пороговый цикл, s – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации, ΔCt – разница Ct между 10-кратными разведениями плазмидных конструкций.

«АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» и «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL». При исследовании отрицательных образцов с использованием нашей разработки наблюдали нарастание специфического флуоресцентного сигнала только в образцах с положительным контролем и по каналам, где проходила детекция эндогенного внутреннего контроля, что подтверждает истинность отрицательного результата. В положительных образцах наблюдали нарастание специфического флуоресцентного сигнала эндогенного внутреннего контроля и только видоспецифичную детекцию генетического материала респираторных возбудителей, ранее выявленных коммерческими тест-системами. Таким образом, диагностическая специфичность наших разработок составила 100%.

Аналитическую специфичность разработанных праймеров определяли методом ПЦР с использованием панели нуклеиновых кислот негриппозных вирусов (FR-674, СДС, Атланта, США). В качестве отрицательного контроля использовали ТЕ-буфер и воду для ПЦР. Состав панели приведен в табл. 4.

Панель содержит геномные РНК и ДНК негриппозных вирусов и микроорганизмов, которые могут вызывать инфекционные заболевания дыхательных путей у человека. При постановке ПЦР детекцию флуоресцентного сигнала наблюдали только для пары праймеров, предназначенных для детекции только конкретного возбудителя, перекрестного детектирования выявлено не было. В отрицательных образцах отмечали рост флуоресцентного сигнала только для внутреннего контроля. Аналитическая специфичность праймеров для детекции негриппозных вирусов в наших исследованиях составила 100%. Оценку аналитической специфичности праймеров, предназначенных для типирования и субтипирования вирусов гриппа, проводили на геномной РНК штаммов вирусов гриппа А (А/Минск/42/09/Н1N1pdm09, А/Минск/108/09/Н3N2) и гриппа В (В/Минск/121/09, В/Солигорск/140/07). Набор праймеров для выявления вируса гриппа А позволяет проводить детекцию РНК вируса гриппа А разных субтипов (Н1N1, Н3N2 и т. д.), набор праймеров для выявления вируса гриппа В – двух эволюционных линий вируса, набор праймеров для субтипирования вируса гриппа А – только определенного субтипа: или Н1N1pdm09 или Н3N2, что было подтверждено в ходе оценки аналитической специфичности праймеров при проведении ПЦР. Аналитическая специфичность праймеров для детекции вирусов гриппа в наших исследованиях также составила 100%.

Для оценки информативности разработанных диагностических наборов использовали такой параметр, как прогностическая ценность метода. Для этого рассматривали прогностическую ценность положительного (+PV) и отрицательного результата (–PV), используя полученные показатели чувствительности и специфичности нашей разработки. Показатели (+PV) и (–PV) в наших исследованиях составили 100%.

Разработанные диагностические наборы были успешно использованы для расшифровки панели образцов в ходе международной интеркалибрации WHO External Quality Assessment Programm (EQAP) по молекулярной диагностике гриппа в рамках проекта ВОЗ для внешней оценки качества мониторинга вирусов гриппа методом ПЦР в период 2014–2019 гг. По результатам анализа получены Международные серти-

Таблица 4
Перечень нуклеиновых кислот негриппозных возбудителей панели FR-674

Возбудитель	Номер продукта
Геномная РНК респираторно-синцитиального вируса человека, штамм 9320 (ATCC® VR-955™)	FR – 596
Геномная РНК респираторно-синцитиального вируса человека, штамм А-2 (ATCC® VR-1540™)	FR – 597
Геномная РНК вируса парагриппа человека 1, штамм С35 (ATCC® VR-94™)	FR – 598
Геномная РНК вируса парагриппа человека 2, штамм Greer (ATCC® VR-92™)	FR – 599
Геномная РНК вируса парагриппа человека 3, штамм С243 (ATCC® VR-93™)	FR – 600
Геномная РНК вируса парагриппа человека 4b, штамм CH (ATCC® VR-1377™)	FR – 601
Геномная РНК риновируса человека 17, штамм 33342 (ATCC® VR-1663™)	FR – 602
Геномная ДНК аденовируса человека 1, штамм аденоиды 71 (ATCC® VR-1™)	FR – 603
Геномная ДНК аденовируса человека 6, штамм миндаины 99 (ATCC® VR-6™)	FR – 604
Геномная РНК коронавируса человека, штамм OC43 (ATCC® VR-1558™)	FR – 605
Геномная РНК коронавируса человека, штамм 229E (ATCC® VR-740™)	FR – 606
Геномная РНК коронавируса человека, штамм NL63	FR – 804
Геномная РНК вируса Коксаки человека В1, штамм Conn-5 (ATCC® VR-28™)	FR – 607
Геномная РНК ЕСНО-вируса 4 человека, штамм Pesascek (ATCC® VR-1734™)	FR – 608
Геномная РНК парэховируса 1 человека, штамм Harris (ATCC® VR-52™)	FR – 609
Геномная ДНК вируса герпеса человека 1-го типа, штамм HF (ATCC® VR-260™)	FR – 610
Геномная ДНК вируса герпеса человека 1-го типа, штамм KOS (ATCC® VR-1493™)	FR – 611
Геномная ДНК вируса герпеса человека 1-го типа, штамм Макинтайр (ATCC® VR-539™)	FR – 612
Геномная ДНК вируса герпеса человека 5-го типа, штамм AD-169 (ATCC® VR-538™)	FR – 613
Геномная РНК вируса кори, штамм Эдмонстон (ATCC® VR-24™)	FR – 614
Геномная РНК вируса краснухи, штамм М-33 (ATCC® VR-314™)	FR – 615
Геномная РНК вируса эпидемического паротита, штамм Эндерс (ATCC® VR-106™)	FR – 616
Геномная ДНК золотистого стафилококка, штамм Сиэтл 1945 (ATCC® VR-25923™)	FR – 374
Геномная ДНК легионеллы пневмофилы, штамм Филадельфия-1 (ATCC® VR-33152™)	FR – 375
Геномная ДНК микоплазмы пневмонии, штамм PI 1428 (ATCC® VR-29085™)	FR – 376
Геномная ДНК хламидофилы пневмонии, штамм CM-1 (ATCC® VR-1360™)	FR – 377
Геномная ДНК пиогенного стрептококка, штамм MGAS 8232 (ATCC® VR-BAA-572™)	FR – 378
Геномная ДНК гемофильной палочки, штамм 49766(ATCC® VR-49766™)	FR – 379
Геномная ДНК синегнойной палочки, штамм RH 815 (ATCC® VR-10145™)	FR – 380
Геномная ДНК эпидермального стафилококка, штамм PCI 1200 (ATCC® VR-12228™)	FR – 381
Геномная ДНК лактобациллы планктарум, штамм Lp 39(ATCC® VR-14917™)	FR – 382
Геномная ДНК бациллыс цереус, штамм FDA5 (ATCC® VR-10702™)	FR – 383
Геномная ДНК менингококка серогруппы б, штамм M2091 (ATCC® VR-13091™)	FR – 384
Геномная ДНК моракселлы катаралис, штамм 59632 (ATCC® VR-BAA-1424™)	FR – 385
Геномная ДНК бордетеллы пертуссис, штамм Тохамма 1 (ATCC® VR-BAA-589™)	FR – 386
Геномная ДНК бордетеллы пертуссис, штамм 10-536 (ATCC® VR-10380™)	FR – 387

фикуты WHO об успешном прохождении теста и соответствии лаборатории международным стандартам по молекулярному анализу вируса гриппа. Разработанные наборы успешно прошли клинические испытания и процедуру государственной регистрации, в рамках которой получены регистрационные удостоверения для разработанных наборов: № ИМ-7.103158 («ФЛУ-ген»), № ИМ-7.103157 («ОРВИ-ген»), № ИМ-7107619 («КОРОНА-ген»).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования разработаны наборы реагентов, позволяющие проводить дифференциальную диагностику возбудителей ОРВИ: «ФЛУ-ген» (для типирования и субтипирования вируса гриппа), «ОРВИ-ген» (для выявления негриппозных возбудителей ОРВИ), «КОРОНА-ген» (для выявления респираторных коронавирусов 229E, NL63, BetaCoV1, HKU1) методом ПЦР в режиме реального времени. Наборы обладают высокими аналитическими показателями, что позволяет использовать данные реагенты для выявления генетического материала респираторных вирусов в клиническом материале пациентов с ОРВИ. Важным критерием разработанных наборов является применение эндогенного внутреннего контроля, с помощью которого можно контролировать не только все этапы ПЦР, но и качество забора материала. Отсутствие флуоресцентного сигнала на канале детекции внутреннего контроля свидетельствует о некорректно забранном материале. Единый протокол амплификации для всех инфекций позволяет максимально загружать амплификатор в каждой постановке, что повышает скорость выдачи результатов анализа и приводит к меньшему износу прибора и увеличению его срока службы. Каждый набор для амплификации укомплектован набором для выделения нуклеиновых кислот «НулеСорб» с применением колонок с сорбирующей мембраной (ТУ ВУ № 100558032.305-2015) и набором для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТАЗА-М-MuLV-50» (ТУ ВУ № 100558032.306-2015) производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Отечественные наборы «ФЛУ-ген» и «ОРВИ-ген» успешно внедрены в практическое здравоохранение и активно используются при проведении Государственного санитарного надзора за гриппом и ОРВИ в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения гриппа», утвержденными постановлением № 217 от 29 декабря 2012. Также данные разработки используются для проведения дифференциальной диагностики ОРВИ при оказании медицинской помощи населению в амбулаторных и стационарных условиях районных, областных и республиканских организаций здравоохранения Республики Беларусь в соответствии с Клиническим протоколом диагностики и лечения детей с заболеваниями органов дыхания, утвержденным приказом № 1536 от 27.12.2012. В период 2016–2019 гг. на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии произведено 1095 наборов «ФЛУ-ген» и 290 наборов «ОРВИ-ген». В 2019 году планируется внедрение в практику 30 наборов «КОРОНА-ген» с последующим увеличением выпуска в 2020–2021 гг. до 60 наборов в год. Согласно данным централизованных закупок для проведения Госсанэпиднадзора, направленного на обеспечение эпидемиологического благополучия населения и совершенствование эпидемиологического слежения за инфекционными и паразитарными болезнями, а также с учетом потребности стационаров в реагентах для дифференциальной диагностики возбудителей ОРВИ количество выпускаемых наборов полностью покрывает потребность нашей страны в диагностических препаратах, предназначенных для выявления респираторных вирусов на основе метода ПЦР.

Производство отечественных наборов способствовало валютосбережению, внедрению в практическое здравоохранение импортозамещающих диагностических реагентов, обладающих высокими аналитическими показателями, а также позволило снизить стоимость одного исследования за счет снижения себестоимости при использовании отечественных реагентов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Wald E.R., Applegate K.E., Bordley C., Darrow D.H., Glode M.P. (2013) Clinical practice guideline for the diagnosis and management of acute bacterial sinusitis in children aged 1 to 18 years. *Pediatrics*, vol. 132(1), pp.262–280.
2. Lobzin Yu.V., Lihopoenko V.P., Lvov N.I. (2000) *Vozdushno-kapelnyie infektsii* [Airborne infections]. SPb.: IKF "Foliant", 184 p. (in Russian)
3. Tyagi S., Kramer F.R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, vol. 14(3), pp. 303–308.
4. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. (2008) *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, NY: Springer.
5. Yuryev A. (2007) *PCR Primer Design*. vol. 402. Totowa, New Jersey, Humana Press.

Поступила/Received: 14.08.2019
Контакты/Contacts: sivets_n@mail.ru

УДК 57.083.337:616-009.863-053.1-079.4

Гурьянова И.Е., Коростелева Л.Б., Полякова Е.А., Пугачёва В.В., Ермилова Т.И., Скоповец Е.Я., Любушкин А.В., Жаранкова Ю.С., Алешкевич С.Н., Белевцев М.В.

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

Guryanova I., Korosteleva L., Polyakova E., Pugacheva V., Ermilova T., Skapavets K., Liubushkin A., Zharankova Yu., Aleshkevich S., Belevtsev M.

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

Исследование компонентов системы комплемента в дифференциальной диагностике врожденного (наследственного) ангионевротического отека

Study of the Components of the Complement System in Differential Diagnostics of Congenital (Hereditary) Angioedema

Резюме

Введение. Врожденный ангионевротический отек (BAO) – редкое врожденное заболевание, характеризующееся отеком в различных частях тела, включая конечности, лицо и гортань. Наиболее опасными являются отеки верхних дыхательных путей, которые могут вызвать удушье.

Цель. Изучить роль компонентов системы комплемента для дифференциальной диагностики форм врожденного ангионевротического отека.

Материалы и методы. В исследование было включено 62 пациента, из них 15 в возрасте до 18 лет, 47 в возрасте 18 лет и старше. Среди 62 исследованных пациентов 50 (18 мужчин, 32 женщины) из 20 семей были с BAO I типа и 12 (5 мужчин, 7 женщин) из 5 семей – с BAO II типа. В ходе лабораторного исследования определялись количество компонента системы комплемента C4, ингибитора C1, ингибитора функциональной активности C1 и ингибитора экспрессии C1 относительно экспрессии гена GUS. Наличие мутаций подтверждалось использованием технологий капиллярного или высокопроизводительного секвенирования; крупные поломки определяли методом мультиплексной пробозависимой лигазной реакции (MLPA).

Результаты и обсуждение. Медиана количества C4 для пациентов с BAO до 11 лет составила 0,06 г/л (норма 0,1–0,4 г/л), для пациентов старше 11 лет – 0,08 г/л (норма 0,2–0,5 г/л). Медиана количества C1-ингибитора для пациентов с BAO I типа составила 0,057 г/л, для пациентов с BAO II типа – 0,44 г/л (норма 0,21–0,39 г/л). Медиана функциональной активности C1-ингибитора составила <15,6% независимо от типа BAO (норма 77,3–128,8%), что подтверждает возможность дифференциальной диагностики BAO по типам, с учетом лабораторных показателей компонентов системы комплемента. При этом, однако, необходимо учитывать, что уровень C4 у пациентов с генетически подтвержденным BAO оставался в норме у 8,1% пациентов. Экспрессия C1-ингибитора у пациентов с BAO I типа была значительно снижена (более 50%) относительно контрольной группы. Не было обнаружено различий в экспрессии

C1-ингибитора у представителей контрольной группы и пациентов с БАО II типа. Таким образом, для пациентов с БАО I типа уровни белка намного ниже ожидаемых 50%; это позволяет полагать, что мутации в гене SERPING1, вызывающие БАО из-за дефицита C1-ингибитора, оказывают доминантно-негативный эффект.

Заключение. Измерение показателей компонентов системы комплемента необходимо для дифференциальной диагностики БАО I и II типа от других брадикинин-индуцированных отеков либо приобретенных ангионевротических отеков, при этом определение функциональной активности C1-ингибитора является наиболее точным показателем.

Ключевые слова: наследственный ангионевротический отек, ангионевротический отек, ингибитор C1, функциональная активность ингибитора C1, экспрессия ингибитора C1, дефицит ингибитора C1.

Abstract

Introduction. Hereditary angioedema (HAE) is a rare congenital disease characterized by edema in various parts of the body, including the limbs, face and larynx. The most dangerous is the edema of the upper respiratory tract, which can cause suffocation.

Purpose. To study the role of components of the complement system for the differential diagnostics of forms of congenital angioedema.

Materials and methods. The study consisted of 62 patients, including 15 patients under the age of 18 years and 47 patients aged 18 years and older. Among the examined 62 patients, 50 (18 men, 32 women) of 20 families were with type I AD and 12 (5 men, 7 women) of 5 families were with type II. In the laboratory study, the amount of the complement component of the C4 system, C1 inhibitor, C1 functional activity inhibitor, and C1 expression inhibitor relative to the GUS gene expression were determined. The presence of mutations was confirmed using capillary or highly productive sequencing technologies; major failures were determined with the method of multiplex probe-dependent ligase reaction (MLPA).

Results and discussion. The median of the amount of C4 for patients with HAE under 11 years was 0.06 g/l (norm 0.1–0.4 g/l); for patients older than 11 years – 0.08 g/l (norm 0.2–0.5 g/l). The median of the amount of C1 inhibitor for patients with HAE type I was 0.057 g/l, for patients with HAE type II – 0.44 g/l (norm 0.21–0.39 g/l). The median of the functional activity of the C1 inhibitor was <15.6%, regardless of the type of HAE (norm 77.3–128.8%), which confirms the possibility of differential diagnostics of HAE by type, taking into account laboratory parameters of the components of the complement system. However, it should be taken into account that the level of C4 in patients with genetically confirmed HAE remained normal in 8.1% of patients. The expression of C1 inhibitor in patients with type I HAE was significantly reduced (more than 50%) relative to the control group. No differences were found in the expression of C1 inhibitor in the control group and patients with type II HAE. Thus, for patients with type I AD, protein levels are below the expected 50%. This lets to suggest that mutations in the SERPING1 gene that cause HAE due to deficiency of the C1 inhibitor have a dominant negative effect.

Conclusion. The measurement of the components of the complement system is necessary for the differential diagnostics of HAE type I and type II from other bradykinin-induced edema or acquired angioedema. Determination of the functional activity of the C1 inhibitor is the most accurate indicator.

Keywords: hereditary angioedema, angioedema, C1 inhibitor, functional activity of C1 inhibitor, expression of C1 inhibitor, deficiency of C1 inhibitor.

■ ВВЕДЕНИЕ

Врожденный ангионевротический отек (BAO) – редкое и опасное для жизни заболевание, которое проявляется в виде острых, нередко продолжающихся в течение нескольких суток и поражающих любые участки тела приступов отеков слизистой оболочки. Наиболее опасными являются отеки верхних дыхательных путей, которые могут вызвать удушье.

BAO является генетическим заболеванием, которое относится к группе брадикинин-опосредованных ангионевротических отеков [1]. Согласно современной классификации [2], выделяют две группы: BAO вследствие дефицита C1-ингибитора и BAO, не зависящий от C1-ингибитора.

К группе BAO, обусловленного дефицитом C1-ингибитора, относятся BAO I и II типа, на долю которых приходится 99% всех BAO. BAO вследствие дефицита C1-ингибитора является аутосомно-доминантным заболеванием, вызванным мутациями в гене SERPING1, кодирующем C1-ингибитор. Распространенность BAO I и II типа в мире оценивается между 1:10 000 и 1:50 000 без расовых или половых различий. В соответствии с уровнями белка C1-ингибитора в плазме крови были описаны два фенотипа BAO: тип I – с низким уровнем циркулирующего белка в плазме ($\approx 85\%$) и тип II ($\approx 15\%$), при котором белок присутствует, но не функционирует. Структурные аномалии гена SERPING1 у пациентов с BAO весьма гетерогенны. Поскольку BAO является генетическим заболеванием, то семейный анамнез оказывается отягощенным; для гена SERPING1 характерны спонтанные генетические изменения и в 25% мутации обнаружены de novo, т. е. семейный анамнез может быть не отягощенным.

К группе BAO, не связанной с уровнями C1-ингибитора, относится BAO III типа ($< 1\%$ от всех BAO). На данный момент в классификацию третьего типа включены 3 гена: ANGPT1 [3], FXII [4], PLG [5].

Данное исследование посвящено установлению лабораторных критериев, характерных для группы BAO вследствие дефицита C1-ингибитора. C1-ингибитор – это регуляторный белок, функцией которого является ингибирование различных сериновых протеаз систем комплемента, кинин-калликреиновой системы, каскада свертывания и фибринолиза [6].

Белок C1-ингибитора состоит из двух отдельных доменов: C-концевого серпинового домена и высокогликозилированного N-концевого домена, который ответственен за ингибирование протеазы. C1-ингибитор играет ключевую роль в контроле классического и лектинового путей комплемента. Активация комплемента инициируется молекулами распознавания C1q и маннозо-связывающим лектином (MBL), которые обычно распознают комплексы антиген – антитело или чужеродные полисахариды соответственно. Связанные протеазы (C1r, C1s, MASP-1 и MASP-2) затем активируют систему комплемента. C1-ингибитор блокирует активность всех этих комплексов [7], является основным регулятором активированного фактора свертывания крови XII и калликреина плазмы и ограничивает образование вазоактивного пептида брадикинина [8, 9].

Снижение функциональной активности C1-ингибитора может привести к неконтролируемой активации контактной системы на эндотелиальных поверхностях с высвобождением брадикинина; брадикинин активирует брадикинин В2-рецептор, вызывая расширение сосудов, повышение проницаемости сосудов и утечки плазмы во внеклеточное пространство, приводящее к образованию отека. Произведенный брадикинин активен только в течение короткого времени, поскольку в организме присутствуют ферменты, разрушающие кинины – кинаиназы, такие как эндопептидаза Н, дипептидилпептидаза IV, аминопептидазы P1 и P2, ангиотензинпревращающий фермент (АПФ); все они расщепляют брадикинин до неактивных пептидов [10].

Следовательно, дефекты в одном из 2 аллелей гена SERPING1 приводят к недостаточной регуляции этих систем и к развитию эпизодов ангионевротического отека у пациентов с ВАО из-за снижения секреции белка (тип I) или дисфункциональной продукции белка (тип II).

Ген SERPING1 расположен на 11-й хромосоме (11q12-q13.1) и представлен восемью экзонами, первый из них состоит из некодирующих последовательностей, а во втором экзоне находится сигнальный пептид длиной 22 п.н. Интроны между 3–4, 4–5, 6–7 и 7–8-м экзонами особенно богаты Alu-регионами, что делает ген склонным к большим делециям и дупликациям, на долю которых приходится примерно 15% всех поломок, приводящих к ВАО [11].

У большинства пациентов с ВАО II типа мутации находятся в реактивном центре молекулы или рядом с ним (P1 – P1') [12].

Для пациентов с ВАО I типа характерны низкие количественные и функциональные уровни C1-ингибитора (менее 50% от нижней границы нормы), в то время как пациентам с ВАО II типа свойственны нормальное или повышенное количество C1-ингибитора, но низкая функциональная активность C1-ингибитора [1]. На сегодняшний день выявлено более 560 мутаций, вызывающих дефицит C1-ингибитора, приводящих к сбою в формировании или в проявлении активности белка C1-ингибитора [13]. В 75% случаев при ВАО с дефицитом C1-ингибитора семейный анамнез будет отягощен.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить роль компонентов системы комплемента для дифференциальной диагностики форм врожденного ангионевротического отека.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 62 пациента из 25 неродственных семей с генетически подтвержденным ВАО, которые были диагностированы в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» с 2010 по 2019 г. Информированное согласие было получено у всех пациентов и/или их официальных опекунов.

Определение количества компонента системы комплемента C4

Определение количества компонента системы комплемента C4 выполнялось с применением иммунотурбидиметрического метода. Для данного теста использовались пробирки, содержащие антикоагулянт

литий-гепарин. Исследования проводились с использованием наборов Dialab (Австрия) и наборов Abbott (США) на приборе Thermo Scientific Konelab Primer 60i (Thermo Scientific, США) в день забора крови.

Определение количества С1-ингибитора

Определение количества С1-ингибитора осуществлялось с применением нефелометрического метода. Для данного теста использовались пробирки без антикоагулянта. Исследования проводились с применением наборов N Antiserum to Human C1-Inhibitor, Siemens (Германия) на приборе Dade Behring BN ProSpec, Siemens (Германия). Сыворотка замораживалась и хранилась при -80°C , тест выполнялся как только количество пациентов, ожидающих тест, равнялось 40.

Определение функциональной активности С1-ингибитора

Для данного теста использовались пробирки с антикоагулянтом цитрат Na. Пробирки со взятой в них кровью центрифугировались не позднее двух часов с момента забора. Исследование проводилось с использованием набора TECHNOCHROM® C1-INH (Австрия) на мультidetекторе Sunrise, TECAN (Швейцария) с применением фотометрического анализа. Данный метод позволяет определять активность С1-ингибитора по способности ингибировать С1-эстеразу. Плазма замораживалась и хранилась при -80°C . Как только количество пациентов, ожидающих тест, равнялось 25, тест выполнялся. Для теста использовали четыре стандарта (125%; 62,5%; 31,250%; 15,625%), относительно которых рассчитывались результаты теста.

Определение молекулярно-генетических нарушений

Геномная ДНК была выделена из периферических лейкоцитов, используя метод фенол-хлороформной экстракции. Секвенирование выполнялось на капиллярном генетическом анализаторе API 3130, Applied Biosystems (США) либо на высокопроизводительном генетическом анализаторе MiSeq, Illumina (США). Полученные по результатам секвенирования нуклеотидные последовательности пациента сравнивались с референсными [14].

При капиллярном секвенировании анализ проводился при помощи специализированного программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 и BioEdit. При применении высокопроизводительного секвенирования аннотация выявленных вариантов выполнялась с применением программ VariantStudio3.0 и IGV. Для поиска крупных делеций или вставок применяли мультиплексно пробозависимую лигазную реакцию (MLPA), используя SALSA MLPA P243-A2 SERPING1 набор (MRC-Holland, The Netherlands), результаты интерпретировались в программе Coffalyser.

Определение экспрессии С1-ингибитора методом ПЦР «в режиме реального времени»

РНК для исследования выделялась из суспензии лейкоцитов пациентов. Для контроля качества РНК использовались показатели спектрофотометра 260 и 280 нм и электрофорез в 1,5%-м агарозном геле для визуализации наличия 18S и 28S субъединиц рибосомальной РНК; кДНК синтезировалась из 1 μg РНК.

Таблица 1
Праймеры, позволяющие детектировать экспрессию C1-ингибитора

Название	Последовательность нуклеотидов	Кол-во нуклеотидов	t° отжига праймеров	Длина продукта (bp)
C1_expr_F	GCTTCACGACCAAAGGTGTC	20	59,41	137
C1_expr_R	GGCGTCACTGTTGTTGCTTA	20	59,06	
C1_probe	TCCACAGCCAGACCTGGCCATAAG	25	69	

Примечание: *(Метка, 5' – FAM; Метка, 3' – BHQ).

Для определения экспрессии C1-ингибитора мы выбрали праймеры (табл. 1).

ПЦР «в режиме реального времени» проводилась на базе амплификатора Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, США) при поддержке программного обеспечения Real-time CFX Manager Software.

Определение общей кДНК C1NH было осуществлено у 36 пациентов с БАО I типа (11 мужчин, 25 женщин), 10 пациентов с БАО II типа (4 мужчины, 6 женщин) и 57 здоровых доноров (19 мужчин, 38 женщин). Все пациенты, включенные в исследование, как минимум на протяжении двух недель не имели ангионевротических отеков и не применяли какое-либо лечение. Мутации у пациентов с БАО I типа распределились следующим образом: дефекты в сплайс-сайтах (16), миссенс-мутации (9), сдвиг рамки считывания из-за небольших делеций (8), крупные делеции (2), нонсенс-мутации (1). Мутации у пациентов с БАО II типа были представлены только миссенс-мутациями. Экспрессия C1-ингибитора нормализовалась по уровню экспрессии гена GUS. Каждый образец раскапывался в триплете.

Статистический анализ

Анализ данных проводился с помощью программы StatSoft 8.0 и с использованием аналогового арифметического преобразования результатов. Оценка тяжести атак определялась согласно критериям BYGUM [15]. Данные были взяты из анкет, заполненных пациентами, и/или из медицинских карт.

Был определен коэффициент корреляции для всех тестов. Непараметрический тест Манна – Уитни был использован для сравнения экспрессии C1-ингибитора между контролями и пациентами. Для того чтобы узнать, есть ли зависимость между типом мутации и показаниями экспрессии C1-ингибитора и есть ли зависимость между показаниями экспрессии C1-ингибитора и тяжестью протекания атак, был использован критерий Краскела – Уоллиса (K-W). Значения считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование было включено 62 пациента (23 мужчины (37%), 39 женщин (63%)) из 25 неродственных семей с генетически подтвержденным БАО. Среди исследованных пациентов было 15 пациентов в возрасте до 18 лет и 47 пациентов в возрасте 18 лет и старше. Таким образом, количество детей, взятых в исследование, составило 24%.

Среди 62 исследованных пациентов 50 были с ВАО I типа (18 мужчин, 32 женщины) из 20 семей и 12 пациентов с ВАО II типа (5 мужчин, 7 женщин) из 5 семей. Клинические и лабораторные данные представлены в табл. 2.

Средний возраст пациентов составил 33 года (от 2 до 68 лет). Средний возраст появления первых клинических симптомов составлял 12 лет (от 1 до 43 лет). Медиана клинической тяжести составила 6,0 (из 10,0; диапазон 2–10). Для восьми пациентов (13%) диагноз был поставлен на досимптомной стадии.

Мутационный скрининг кодирующей области гена SERPING1 и прилегающих к ним сплайс-сайтов выявил 23 различные мутации. По типу мутации распределились следующим образом: 5 дефектов в сплайс-сайтах (21,7%), 9 миссенс-мутации (39,1%), 6 небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания (26,1%), 1 крупная делеция (4,4%), 2 нонсенс-мутации (8,7%). Мутации de novo были выявлены у одиннадцати пациентов (17,8%), то есть их семейный анамнез не был отягощен.

Таблица 2
Клинические и лабораторные данные пациентов с ВАО

ID пациента / № семьи	Пол	Возраст (лет)	Возраст на момент первых атак (кол-во лет)	Кол-во С4 (г/л)	Кол-во С1-ингибитора (г/л)	Экспрессия С1-ингибитора	Функциональная активность С1-ингибитора (%)	Оценка тяжести (BYGUM)	Тип мутации
001/1	м	10	1	0,06	0,0595	NA	NA	6	Splicing
002/1	м	17	4	0,062	0,0758	NA	NA	8	Splicing
003/2	ж	23	14	0,069	0,072	NA	NA	2	Missense
004/3	м	9	Не было	0,07	0,094	NA	NA	–	Frameshift
005/4	м	26	1	0,12	0,065	0,66	NA	7	Frameshift
006/5	м	36	3	0,043	0,043	0,69	NA	9	Large del
007/6	ж	19	1	0,04	0,0477	NA	NA	9	Nonsense
008/1	м	40	<1	0,47	0,061	0,11	NA	7	Splicing
009/9	м	62	<1	0,08	0,0491	0,31	NA	9	Splicing
010/2	ж	68	22	0,1	0,0447	0,38	NA	2	Missense
011/4	м	26	3	0,18	0,101	NA	NA	9	Frameshift
012/4	ж	51	3	0,08	0,0324	NA	NA	7	Frameshift
013/4	ж	47	17	0,11	0,089	0,5	NA	10	Frameshift
014/7	ж	32	18	0,06	0,0645	0,17	NA	5	Splicing
015/1	ж	5	Не было	0,13	0,0709	0,12	NA	–	Splicing
016/8	ж	21	15	0,05	0,0422	0,19	NA	6	Frameshift
017/9	ж	29	18	0,0204	0,0348	0,59	NA	4	Nonsense
018/10	ж	16	3	0,1	0,0478	0,19	NA	7	Splicing
019/11	м	26	12	0,1	0,0483	NA	NA	6	Frameshift
020/2	м	40	28	0,13	0,0664	NA	NA	4	Missense
021/12*	ж	51	3	0,09	0,303	NA	NA	8	Missense
022/1	ж	36	20	0,08	0,0407	0,29	NA	5	Splicing
023/12*	ж	31	12	0,09	0,374	3,43	NA	6	Missense

Окончание таблицы 2.

ID пациента / № семьи	Пол	Возраст (лет)	Возраст на момент первых атак (кол-во лет)	Кол-во C4 (г/л)	Кол-во C1-ингибитора (г/л)	Экспрессия C1-ингибитора	Функциональная активность C1-ингибитора (%)	Оценка тяжести (BYGUM)	Тип мутации
024/7	ж	59	43	0,11	0,0459	0,03	NA	4	Splicing
025/2	ж	62	22	0,15	0,0721	0,13	NA	2	Missense
026/2	м	14	Не было	0,11	0,052	0,29	NA	–	Missense
027/13	ж	35	20	0,11	0,0455	0,44	NA	6	Splicing
028/14	м	14	12	0,17	0,113	NA	NA	2	Missense
029/1	м	44	3	0,080	0,0284	0,48	NA	9	Splicing
030/10	м	15	8	0,130	0,095	0,05	NA	3	Splicing
031/10	ж	36	23	0,270	0,151	0,19	NA	6	Splicing
032/10	ж	56	14	0,140	0,0797	0,21	NA	7	Splicing
033/10	ж	45	18	0,100	0,0538	0,54	NA	5	Splicing
034/13	ж	65	31	0,090	0,0375	0,54	NA	3	Splicing
035/15	ж	26	17	0,08	0,0678	0,6	NA	9	Missense
036/5	ж	5	Не было	0,11	0,103	NA	NA	–	Large del
037/5	м	60	20	0,08	0,0294	0,26	NA	6	Large del
038/4	ж	2	Не было	0,09	0,109	NA	NA	–	Frameshift
039/16	ж	26	4	0,03	0,0972	0,33	19,2	4	Splicing
040/17	ж	33	15	0,03	0,0477	0,36	<15,6	6	Missense
041/18	ж	61	5	0,05	0,0398	NA	35,4	5	Missense
042/19	ж	62	10	0,04	0,031	0,25	<15,6	4	Missense
043/19	ж	11	9	0,03	0,0629	0,16	32,1	2	Missense
044/19	м	17	Не было	0,03	0,034	0,11	<15,6	–	Missense
045/19	ж	40	10	0,03	0,044	0,15	38,9	5	Missense
046/20	ж	5	4	0,04	0,0529	0,227	16,7	6	Frameshift
047/21*	ж	11	10	0,23	0,285	2,87	NA	8	Missense
048/22*	ж	66	10	0,08	0,728	1,14	NA	8	Missense
049/22*	м	55	17	0,03	0,389	1,43	NA	7	Missense
050/23*	ж	40	13	0,03	0,443	1,45	<15,6	9	Missense
051/23*	м	39	14	0,08	0,533	0,99	<15,6	4	Missense
052/23*	м	22	9	0,04	0,449	0,70	<15,6	7	Missense
053/20	м	45	7	0,03	0,0427	0,29	<15,6	6	Frameshift
054/20	м	40	6	0,06	0,0597	0,09	<15,6	5	Frameshift
055/23*	ж	51	17	0,03	0,49	2,7	<15,6	8	Missense
056/24	ж	65	14	0,03	0,0381	NA	<15,6	8	Frameshift
057/8	ж	49	12	0,09	0,0702	0,52	<15,6	8	Frameshift
058/23*	ж	30	5	0,03	0,444	3,27	34,6	7	Missense
059/11	ж	3	Не было	0,04	0,0631	0,2	NA	–	Frameshift
060/10	ж	15	Не было	0,07	0,0607	0,3	<15,6	–	Splicing
061/23*	м	13	12	0,07	0,633	2,13	<15,6	2	Missense
062/25*	м	27	22	0,039	NA	NA	NA	4	Missense

Примечание: NA – отсутствовал материал, необходимый для выполнения теста.

Таблица 3

Параметры компонентов системы комплемента у пациентов с ВАО

Тип ВАО	Кол-во пациентов	Функ. акт. С1-инг., % (медиана)	Количество С1-инг., г/л (медиана)	Количество С4, г/л (медиана)
1	50	<15,6	0,057	0,08
2	12	<15,6	0,44	0,055

Для пациентов с ВАО I типа значения С4 колебались от 0,02 до 0,47 г/л; С1 – от 0,029 до 0,151 г/л. Для пациентов с ВАО II типа значения С4 колебались от 0,03 до 0,23 г/л; С1 – от 0,29 до 0,72 г/л. Уровень С4 у пациентов с генетически подтвержденным ВАО оставался в норме у 8,1% пациентов.

В 15% случаев дефицита С1-ингибитора (ВАО тип II) его концентрация остается в норме, снижена только его функциональная активность. Поэтому функциональная активность С1-ингибитора (ингибирующая способность) – наиболее емкий диагностический показатель для диагностики ВАО. Для ВАО I и II типа характерно снижение функциональной активности С1-ингибитора от <25% до 40%. Поскольку мы использовали дополнительный четвертый стандарт, равный 15,6%, в нашей выборке показатель снижения функциональной активности С1-ингибитора был от <15,6% до 40% (табл. 3).

Лабораторные нормы: С4 0,1–0,4 г/л для возраста от 1 до 11 лет и 0,2–0,5 г/л для возраста от 11 лет; С1-инг. 0,21–0,39 г/л; С1-инг. функ. 77,3–128,8%.

Измерение экспрессии С1-ингибитора нормализовалось по уровню экспрессии GUS. Результаты статистического анализа показали значительное снижение уровня экспрессии С1-ингибитора у пациентов с ВАО по сравнению с таковым в контрольной группе. Медиана экспрессии С1-ингибитора у пациентов составила 0,68 (n=46), медиана экспрессии С1-ингибитора у пациентов контрольной группы составила 1,70 (n=57) (p=0,000000, тест Манна – Уитни). При поотдельном сравнении между собой показателей пациентов с ВАО I типа и пациентов с ВАО II типа с контрольной группой также была установлена статистически значимая зависимость (p=0,0000, тест Краскела – Уоллиса, рис. 1). Медиана экспрессии С1-ингибитора у пациентов с ВАО I типа составила 0,26 (n=36), медиана экспрессии С1-ингибитора у пациентов с ВАО II типа составила 1,79 (n=10).

С учетом того, что у пациентов с ВАО I типа мутации различаются по типам (дефекты в сплайс-сайтах (Splicing), n=16, миссенс-мутации (Missense), n=9, небольшие делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания (Frameshift), n=8, крупные делеции (Large del), n=2, нонсенс-мутация (Nonsense), n=1), был осуществлен более детальный анализ для сравнения уровня экспрессии С1-ингибитора между пациентами контрольной группы (n=57) и пациентами с различными типами мутаций. Никаких статистически значимых различий между экспрессией С1-ингибитора и типом мутации не было выявлено (p=0,408, тест Краскела – Уоллиса, рис. 2).

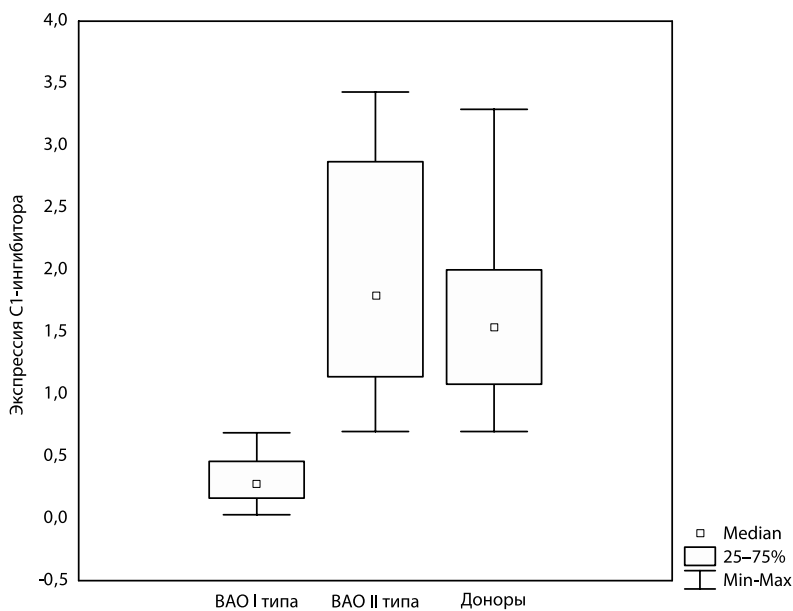


Рис. 1. Сравнение уровня экспрессии С1-ингибитора между пациентами с ВАО I типа, ВАО II типа и контрольной группой

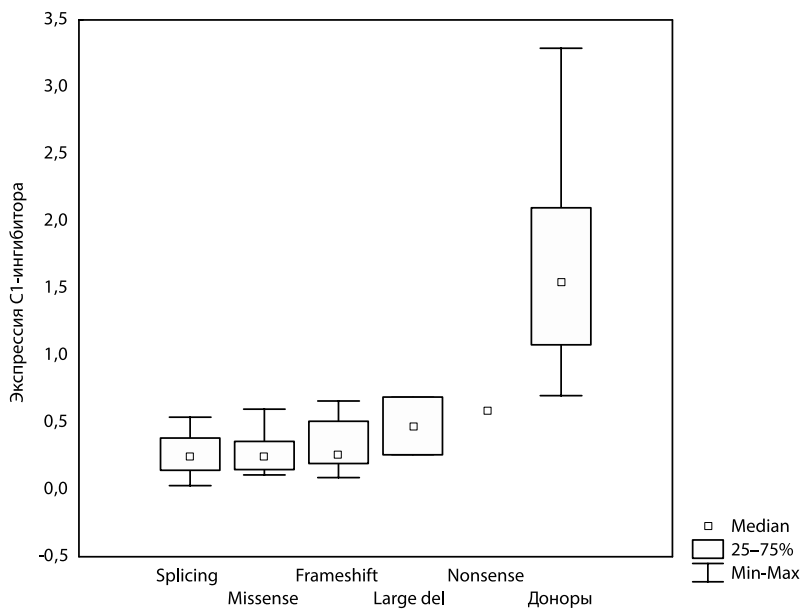


Рис. 2. Сравнение уровня экспрессии С1-ингибитора между пациентами контрольной группы и пациентами с различными типами мутаций

Для того чтобы установить, есть ли зависимость между экспрессией С1-ингибитора и тяжестью протекания атак, а также между типом мутации и тяжестью протекания атак, был использован критерий Краскала – Уоллиса (K–W). За H_0 была принята гипотеза, в соответствии с которой степень тяжести протекания атак должна различаться в зависимости от уровня экспрессии С1-ингибитора либо от типа мутации. Используя непараметрический критерий K–W, достигнут уровень значимости $p=0,3567$ ($n=39$). Так как уровень значимости $p<0,05$ не достигнут, то H_0 может быть отклонена.

Следовательно, зависимой корреляции между экспрессией С1-ингибитора и степенью тяжести проявления заболевания, а также между типом мутации и тяжестью протекания атак не было выявлено.

■ ВЫВОДЫ

1. Медиана количества С4 для пациентов с ВАО до 11 лет составила 0,06 г/л (норма 0,1–0,4 г/л), для пациентов старше 11 лет – 0,08 г/л (норма 0,2–0,5 г/л). Для ВАО I и II типа характерно снижение показателей более 50% от нижней границы нормы, но при этом нужно учитывать, что приблизительно у 2–4% пациентов с ВАО уровень С4 остается в пределах нормы. В нашем исследовании уровень С4 у пациентов с генетически подтвержденным ВАО оставался в норме у 8,1%.
2. Для пациентов с ВАО I типа характерны низкие количественные и функциональные уровни С1-ингибитора (менее 50% от нижней границы нормы), в то время как пациентам с ВАО II типа свойственны нормальное или повышенное количество С1-ингибитора, но низкая функциональная активность С1-ингибитора. В нашем исследовании медиана количества С1-ингибитора для пациентов с ВАО I типа составила 0,057 г/л, для пациентов с ВАО II типа – 0,44 г/л (норма 0,21–0,39 г/л), что соответствует характерным результатам количества С1-ингибитора при дифференцировке I и II типа ВАО. Медиана функциональной активности С1-ингибитора составила <15,6% независимо от типа ВАО (норма 77,3–128,8%). Таким образом, определение функциональной активности С1-ингибитора в 100% случаях поможет выставить правильный диагноз для пациентов с дефицитом (количественным и функциональным) С1-ингибитора и назначить соответствующее лечение.
3. Экспрессия С1-ингибитора нормализовалась по уровню экспрессии гена GUS и была значительно снижена относительно контрольной группы для пациентов с ВАО I типа (медиана 0,26), а для пациентов с ВАО II типа оставалась в норме или была завышена (медиана 1,79). Медиана экспрессии С1-ингибитора при исследовании пациентов контрольной группы составила 1,70. Таким образом, для пациентов с ВАО I типа уровни белка оказались намного ниже ожидаемых 50%, что показывает, что мутации в гене SERPING1, вызывающие ВАО из-за дефицита С1-ингибитора, проявляют доминантно-негативный эффект.
4. При сопоставлении результатов экспрессии С1-ингибитора и степени тяжести проявления заболевания, а также при сопоставлении типа мутации и тяжести протекания атак зависимой корреляции не было выявлено.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП «Фундаментальные и прикладные науки – медицине, 2016–2020 годы» (подпрограмма «Диагностика и терапия заболеваний») (грант № 44, № госрегистрации 20190517).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Agostoni A. (2004) Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 114, no 3, pp. 51–131.
2. Maas C. (2019) Hereditary Angioedema: Insights into inflammation and allergy. *Molecular Immunology*, vol. 112, pp. 378–386.
3. Bafunno V. (2014) Mutational spectrum of the C1 inhibitor gene in a cohort of Italian patients with hereditary angioedema: Description of nine novel mutations. *Annals of Human Genetics*, vol. 78, no 2, pp. 73–82.
4. Cichon S. (2006) Increased activity of coagulation factor XII (Hageman Factor) causes hereditary angioedema type III. *American Journal of Human Genetics*, vol. 79, № 6, pp. 1098–1104.
5. Bork K. (2018) Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 73, no 2, pp. 442–450.
6. Nussberger J. (1999) Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.*, no 104, pp. 1321–1322.
7. Beinrohr L. (2008) C1 MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med.*, no 14, pp. 511–521.
8. Cugno M. (2003) Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol.*, no 3, pp. 311–318.
9. Davis 3rd AE. (2008) Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol.*, no 45, pp. 4057–4063.
10. Kaplan A.P. (2010) Kinin formation in C1 inhibitor deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, no 125, pp. 1411–1412.
11. Carter P.E. (1991) Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Biochem*, no 97, pp. 301–308.
12. Bos I.G. (2002) Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiology*, no 205, pp. 518–533.
13. HGMD® Professional [Electronic resource]. The Human Gene Mutation Database. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Data of access: October 3, 2018.
14. Ensembl genome browser 95 [Electronic resource]. Ensembl release 97. Available at: <http://www.ensembl.org/index.html>. Data of access: April 5, 2019.
15. Bygum A. (2011) Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy*, vol. 66, pp. 76–84.

Поступила/Received: 09.09.2019
Контакты/Contacts: guryanovairina85@gmail.com

УДК 616.61-089.843-076:612.017.1

Зыблева С.В., Зыблев С.Л.

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

Zybleva S., Zyblev S.

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

Оценка аллогенного иммунного ответа у реципиентов при трансплантации почки

Assessment of Allogeneic Immune Response in Kidney Transplant Recipients

Резюме

Цель. Изучить характер проявления аллогенного иммунного ответа реципиентов почечного трансплантата с использованием донорского лимфоцитарного диагностикума.

Материалы и методы. При трансплантации почки 74 реципиентам на этапе подготовки органа к пересадке выделяли из донорского материала парааортальные лимфатические узлы с последующим получением лимфоцитарного диагностикума. Затем у реципиентов почечного аллотрансплантата определяли аллоиммунный ответ на антигены донорского органа путем сравнения коэффициента прироста для субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ реципиента при инкубации лимфоцитов реципиента с лимфоцитарным диагностикумом, фитогемагглютинином и при инкубации монокультуры лимфоцитов реципиентов.

Результаты и обсуждение. Полученная лимфоцитарная взвесь, приготовленная из региональных лимфатических узлов донора, имела в своем составе CD3⁺-лимфоциты (экспрессирующие молекулы HLA) I класса (51,30% [40,8; 67,9]) и B-лимфоциты, экспрессирующие HLA II класса (47,30% [29,4; 52,4]). Проведено культивирование лимфоцитов реципиента в течение 72 часов. Первый образец – контрольный, предназначен для оценки реакции при культивации монокультуры. Во второй образец перед культивацией добавляли 0,1 мл лимфоцитарного диагностикума (ЛД). В третий образец перед культивацией добавляли 0,1 мл фитогемагглютина (ФГА). Путем математического расчета определен коэффициент прироста субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ во всех исследуемых образцах. Разброс коэффициентов прироста для CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов после культивирования с лимфоцитарным диагностикумом находился в пределах от -5,56% (нижний квартиль) до +90,48% (верхний квартиль). Коэффициент прироста для CD3⁺HLA-DR⁺ после культивирования с фитогемагглютинином составил величины в пределах от +135,65% (нижний квартиль) до +683,33% (верхний квартиль).

Заключение. Результат выполненной работы заключается в оценке аллогенного иммунного ответа реципиента по уровню изменения экспрессии HLA-DR, детектированному с помощью проточной цитофлуориметрии на лимфоцитах после их инкубации в среде с донорским лимфоцитарным диагностикумом, полученным из лимфатических узлов донора и содержащим антигены главного комплекса гистосовместимости I и II классов. Положительный коэффициент прироста CD3⁺HLA-DR⁺ после инкубации лимфоцитов реципиента с лимфоцитарным диагностикумом указывает на положительный аллогенный иммунный ответ.

Предложенный метод позволяет проводить оценку предсуществующей сенсibilизации лимфоцитов пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации с использованием лимфоцитарного диагностикума с целью выполнения ранних профилактических мероприятий по коррекции иммуносупрессивной терапии.

Ключевые слова: трансплантация почки, субпопуляции лимфоцитов, HLA-DR, T-лимфоциты, аллогенный иммунный ответ.

Abstract

Purpose. To study allogeneic immune response of kidney transplant recipient using donor lymphocytic diagnosticum.

Materials and methods. In kidney transplantation, para-aortic lymph nodes with subsequent preparation of lymphocytic diagnosticum were isolated from donor material of 74 recipients at the stage of preparation of the allograft for transplantation. Then alloimmune response to antigens of the donor organ was determined in renal allograft recipients by comparing the growth rate for subpopulation CD3⁺HLA-DR⁺ of the recipient in incubation of recipient's lymphocytes with lymphocytic diagnosticum, phytohemagglutinin, and in incubation of monoculture of recipient's lymphocytes.

Results and discussion. The received lymphocyte suspension, prepared from regional lymph nodes of the donor, consisted of CD3⁺ lymphocytes (expressing HLA molecules) class I (51.30% [40.8; 67.9]) and B-lymphocytes expressing HLA class II (47.30% [29.4; 52.4]). The recipient's lymphocytes were cultivated for 72 hours. The first sample (No. 1) was control, and it was designed to assess the reaction in monoculture cultivation. We added 0.1 ml of lymphocytic diagnosticum to the second sample (No. 2) before cultivation. We also added 0.1 ml of PHA to the third sample (No. 3) before cultivation. For all the studied samples, the growth rate of subpopulation CD3⁺HLA-DR⁺ was determined with mathematical calculation. The scatter of growth rates for CD3⁺HLA-DR⁺ of lymphocytes after cultivation with lymphocytic diagnosticum ranged from -5.56% (lower quartile) to + 90.48% (upper quartile). The growth rate for CD3⁺HLA-DR⁺ after cultivation with phytohemagglutinin was from + 135.65% (lower quartile) to + 683.33% (upper quartile).

Conclusion. The result of our study is in the assessment of allogeneic immune response of recipient, according to the level of change of HLA-DR expression detected with the use of flow cytometry on lymphocytes after their incubation in the medium with donor lymphocytic diagnosticum obtained from the lymph nodes of donor and containing antigens of the main histocompatibility complex of the classes I and II. The positive growth rate of CD3⁺HLA-DR⁺ after incubation of recipient's lymphocytes with lymphocytic diagnosticum confirms positive allogeneic immune response.

The proposed method lets to assess pre-existing lymphocyte sensibilization of patients with chronic kidney disease in organ transplantation using lymphocytic diagnosticum in order to perform early preventive measures to correct immunosuppressive therapy.

Keywords: kidney transplantation, lymphocyte subpopulations, HLA-DR, T-lymphocytes, allogeneic immune response.

■ ВВЕДЕНИЕ

При трансплантации почки обычной процедурой является проведение HLA-типирования реципиента и донора, а также определение аллоантител и постановка прямой перекрестной пробы «кросс-матч тест». Иммунологическая оценка пациентов до и после трансплантации необходима и для индивидуализации иммуносупрессивной терапии, предотвращения реакции отторжения, инфицирования цитомегаловирусом и контроля токсичности ингибиторов кальциневрина [1].

В ответ на чужеродные человеческие лейкоцитарные антигены в организме реципиента вырабатываются донор-специфические антитела (ДСА) и донор-специфические Т-лимфоциты [2].

В настоящее время существует несколько методов определения ДСА в сыворотке реципиента. В основе серологического метода лежит комплементзависимый лимфоцитотоксический тест. В последние годы получили распространение методы мультиплексного анализа с детекцией результатов на платформе Luminex (x-MAP технология) [3]. Для выявления донор-специфических Т-лимфоцитов применяют методику смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) [4–8]. При этом особая трудность отмечается при мультиорганном заборе, когда от одного донора трансплантируют органы нескольким реципиентам, что требует большого количества донорских клеток. Таким образом, для определения ДСА или реакции в СКЛ необходимо большое количество антигенного материала донора. С этой целью используют два вида клеток: лимфоциты периферической крови и лимфоциты селезенки донора [9].

Наиболее доступным для исследования видом ткани донора служит периферическая кровь. В то же время в периферической крови преобладают Т-лимфоциты (60–70%), несущие на себе антигены главного комплекса гистосовместимости I класса. Содержание В-лимфоцитов, главного источника человеческих лейкоцитарных антигенов II класса, малочисленно (10–15%). Так как при оценке результатов лимфоцитотоксического теста гибель до 20% клеток рассматривается как отрицательный результат, низкое содержание В-лимфоцитов может стать причиной неправильной трактовки результатов. Кроме того, «фоновая» гибель клеток более 10% существенно затрудняет интерпретацию полученных результатов [9].

Рядом авторов (Хубутия и соавт., 2013) разработан диагностикум для определения у реципиента образования *de novo* донор-специфических антител к HLA в посттрансплантационном периоде. Авторы описывают результаты исследования 15 образцов взвесей лимфоцитов селезенки доноров, подготовленных к криохраниению. Выявленное ими содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки) варьировало от 27,2% до 33,5%, концентрация В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки) – от 41,2% до 53,3%.

Недостатками используемых методов являются:

- более низкое, чем в периферической крови, содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки), несущих HLA I класса;
- необходимость дополнительной манипуляции с целью заготовки ткани селезенки во время операции эксплантации органов с дополнительной организацией транспортировки;
- невозможность приготовить диагностикум при отсутствии у донора селезенки.

Мы предлагаем использовать для иммунологических тестов лимфоцитарную взвесь, приготовленную из региональных лимфатических узлов донора, которые содержат высокое количество антигенного материала (молекул HLA) как I класса (CD3⁺-лимфоциты), так и высокое количество В-лимфоцитов (CD19⁺), экспрессирующих HLA II класса (Патент Республики Беларусь № 21799, опубл. 30.10.17).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить характер проявления аллогенного иммунного ответа реципиентов почечного трансплантата с использованием донорского лимфоцитарного диагностикума.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦРМ и ЭЧ»), Гомель, Республика Беларусь. Во время операции трансплантации почки на этапе подготовки органа к пересадке выделяли из донорского материала парааортальные лимфатические узлы размером от 6 до 11 мм в диаметре. Лимфатические узлы помещали в стерильную герметичную емкость. Далее в стерильных условиях их фрагментировали, помещали в стерильные пробирки с физиологическим раствором с последующей гомогенизацией. Для удаления крупнодисперсных частиц полученный образец пропускали через стерильный бумажный фильтр с диаметром пор 25 мкм. Взвесь полученных клеток отмывали двукратно в фосфатно-буферном растворе (PBS) методом центрифугирования. В промаркированные пробирки для проточного цитометра с внутренним мыском вносили 100 мкл клеточной взвеси и добавляли моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами CD3 (Fitc) и CD19 (APC) согласно панели исследования в объемах, рекомендованных фирмой-производителем с определением количества Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки), активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки). Образцы перемешивали на вортексе и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. После инкубации в пробирки вносили по 100 мкл лизирующего раствора, содержащего 3,4% формальдегида. Тщательно перемешанные на вортексе образцы инкубировали еще 10 минут в темноте при комнатной температуре. После этого в пробирки вносили по 1 мл дистиллированной воды, образцы перемешивали на вортексе и инкубировали 10 минут при комнатной температуре без доступа света. Затем полученные образцы исследовали на проточном цитофлуориметре и отбирали суспензии с количеством Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки) не менее 40,8%, В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки) не менее 29,4% (Патент BY № 21799). Всего было изготовлено и изучено 74 образца лимфоцитарной взвеси.

Полученный таким образом диагностикум, содержащий Т-лимфоциты и В-лимфоциты, несущие на себе антигены главного комплекса гистосовместимости I и II классов, использовали для проведения оценки клеточной сенсibilизации к антигенам донора. Для этого производили взятие крови из вены реципиента в количестве 5–10 мл в пробирку с гепарином (25 ЕД/мл). Пробирка с кровью доставлялась в лабораторию в течение 2 часов. Содержимое пробирки осторожно перемешивали и оставляли на 60 минут в термостате при температуре, равной 37 °С, для осаждения эритроцитов. После инкубации в термостате надосадочный слой плазмы, обогащенный лейкоцитами, отбирали в отдельную стерильную пробирку и определяли количество лейкоцитов в 1 мл.

Далее взвесь лейкоцитов разводили питательной средой RPMi-1640 с глутамином таким образом, чтобы полученная смесь содержала 20% аутологичной плазмы и 80% культуральной среды. Общий объемом

полученной смеси составил 15 мл. Содержание лейкоцитов составляло не менее 1–2 млн лейкоцитов в 1 мл. Приготовленную смесь делили на три стерильных пластиковых флакона объемом по 5 мл для культивирования в течение 72 часов при температуре 37 °С. Первый образец (№ 1) – контрольный, предназначен для оценки реакции при культивации монокультуры. Во второй образец (№ 2) перед культивацией добавляли 0,1 мл лимфоцитарного диагностикума. В третий образец (№ 3) перед культивацией вносили 0,1 мл фитогемагглютинаина.

Для изучения воспроизводимости метода было выполнено по две дублирующие постановки всех пар доноров-реципиентов.

После завершения культивирования осуществляли иммунофенотипирование клеточных взвесей из всех образцов. Производили двукратную отмывку клеточной взвеси в стандартном растворе PBS методом центрифугирования по 5 мин. при 250g при комнатной температуре. После удаления супернатанта добавляли 400 мкл стандартного раствора PBS с последующим перемешиванием на вихревом смесителе.

Пробирки для проточного цитометра маркировали согласно панели исследования. В каждую пробирку вносили моноклональные антитела (CD3 (Fitc) и CD19 (APC)) в объемах, рекомендованных фирмами-производителями, добавляли по 100 мкл клеточной взвеси и перемешивали вихревым смесителем. В исследовании использовали панели моноклональных антител: CD3/Anti-HLA-DR. Пробы перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин. при комнатной температуре без доступа света. Затем во все пробирки добавляли по 100 мкл лизирующего раствора, пробы перемешивали на вортексе и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре без доступа света. Потом во все пробирки добавляли по 1000 мкл дистиллированной воды, перемешивали на вортексе и еще раз инкубировали 20 мин. при комнатной температуре без доступа света. Конечный этап заключался в анализе на проточном цитофлуориметре полученных путем культивирования смесей.

Полученные с использованием данного метода результаты обработки с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, GS-35F-5899H). Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й (LQ) – нижний квартиль и 75-й (UQ) – верхний квартиль).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки) и В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки) в лимфоцитарном диагностикуме, полученном из лимфатических узлов доноров, представлены в табл. 1.

Таблица 1
Содержание CD3⁺- и CD19⁺-лимфоцитов в полученной из лимфатических узлов донора лимфоцитарной взвеси

Показатель	Me [LQ25; UQ75]
CD3 ⁺ , %	51,30 [40,8; 67,9]
CD19 ⁺ , %	47,30 [29,4; 52,4]

Таблица 2
Содержание CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов в образцах после культивирования

Образец	Me [LQ25; UQ75], %	Min, %	Max, %
№ 1	6,30 [3,40; 13,50]	0,20	28,40
№ 2	8,30 [3,60; 13,60]	2,30	81,00
№ 3	26,50 [16,20; 49,30]	0,80	51,20

Примечания:

№ 1 – инкубация монокультуры лимфоцитов реципиентов;

№ 2 – инкубация с лимфоцитарным диагностикумом;

№ 3 – инкубация с фитогемагглютинином.

С использованием разработанного метода выполнено исследование и получены результаты инкубации лимфоцитов 74 реципиентов почечного аллотрансплантата с лимфоцитарным диагностикумом. Для изучения функциональной активности лимфоцитов параллельно выполнялась инкубация лимфоцитов реципиента с фитогемагглютинином. Полученные данные представлены в табл. 2.

В ходе анализа количества субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ было выявлено значимое различие между образцами № 1 и № 3 ($p=0,000002$) и отсутствие такового между образцами № 1 и № 2 ($p=0,441$). Наличие значимого различия субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ контрольного образца № 1 и образца № 2 с ФГА отражает функциональный потенциал лимфоцитов реципиента, а отсутствие значимых различий субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ между контрольными образцами № 1 и № 3 с антигенным диагностикумом характеризует индивидуальную реакцию иммунной системы на антиген, проявляющуюся как активацией, так и угнетением иммунной системы.

Исходя из этого для персонафицированной оценки результатов был проведен сравнительный анализ динамики коэффициентов прироста (КП) субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ для каждого пациента.

Для субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ рассчитывали коэффициент прироста удельного веса субпопуляции в культуре с лимфоцитарным диагностикумом по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре:

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+_{лд}} = \frac{(CD3^+HLA-DR^+_{лд} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон}}$$

где CD3⁺HLA-DR⁺_{лд} – относительное число клеток субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в культуре лимфоцитов анализируемого пациента с лимфоцитарным диагностикумом (лд), %;

CD3⁺HLA-DR⁺_{кон} – относительное число клеток субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в монокультуре анализируемого пациента (кон), %.

Для оценки уровня функциональной активности лимфоцитов реципиента определяли коэффициент прироста субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в образце № 1 (кон) и в среде с добавлением фитогемагглютина (ФГА) как неспецифического митогена Т-лимфоцитов.

$$КП_{CD3+HLA-DR+фра} = \frac{(CD3+HLA-DR+фра - CD3+HLA-DR+кон) \times 100}{CD3+HLA-DR+кон}$$

где $CD3+HLA-DR+фра$ – относительное число клеток субпопуляции $CD3+HLA-DR+$ в культуре лимфоцитов анализируемого пациента с фитогемагглютинином (ФГА), %;

$CD3+HLA-DR+кон$ – относительное число клеток субпопуляции $CD3+HLA-DR+$ в монокультуре анализируемого пациента (кон), %.

Результаты полученного путем математического расчета коэффициента прироста $CD3+HLA-DR+$ -лимфоцитов представлены в табл. 3.

Из таблицы видно, что $КП_{CD3+HLA-DR+фра}$ у всех обследуемых имел положительное значение. Учитывая, что фитогемагглютинин является неспецифическим стимулятором Т-лимфоцитов [5], рост субпопуляции Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации HLA-DR, рассматривался нами как контроль функционального потенциала активации иммунной системы. Разброс коэффициентов прироста для $CD3+HLA-DR+лд$ находился в пределах от -5,56% до +90,48%, что указывает на изменение экспрессии маркера и характеризует либо угнетение, либо выраженную активацию данной субпопуляции лейкоцитов при аллогенных иммунных взаимодействиях по HLA. Процент пар «донор – реципиент», имеющих отрицательные показатели коэффициента прироста, составил 9,46% (7 пар «донор – реципиент»). Положительный коэффициент прироста $CD3+HLA-DR+лд$ подтверждал положительный аллогенный иммунный ответ реципиента на антигены донора. Исследование воспроизводимости метода показало, что для субпопуляции $CD3+HLA-DR+$ среднее отклонение коэффициента прироста в дублирующих постановках от минимального до максимального составило $9,25 \pm 0,93\%$ при культивировании с ФГА, $9,71 \pm 0,59\%$ при культивировании с ЛД. С учетом того, что среднее отклонение для всех показателей составило $9,48 \pm 0,46\%$, можно сделать заключение о том, что воспроизводимость метода выше 90,52%.

В настоящее время известно множество методов оценки антиген-индуцированной активации лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии. Так, в работе Корольковой О.Ю. и соавт. показано, что стимуляция мононуклеаров анти-CD3 антителами приводит в течение первой недели к повышению экспрессии на них молекул CD25 и HLA-DR [10]. Также известен способ оценки пролиферативной активности лимфоцитов с помощью цитофлуориметрии. Метод основан на

Таблица 3
Показатели коэффициента прироста (КП) субпопуляции лимфоцитов $CD3+HLA-DR+$ в результате культивирования

Коэффициент прироста	Median (%)	Lower Quartile (%)	Upper Quartile (%)
$КП_{CD3+HLA-DR+фра}$	+408,39	+135,65	+683,33
$КП_{CD3+HLA-DR+лд}$	+14,35	-5,56	+90,48

Примечания:

$КП_{CD3+HLA-DR+фра}$ – коэффициент прироста субпопуляции лимфоцитов $CD3+HLA-DR+$ в результате культивирования с ФГА;

$КП_{CD3+HLA-DR+лд}$ – коэффициент прироста субпопуляции лимфоцитов $CD3+HLA-DR+$ в результате культивирования с лимфоцитарным антигеном.

выявлении фракции моноклеаров, экспрессирующих С-концевой фрагмент белка b23/нуклеофозмина [11]. Схожим является способ определения пролиферативной активности лимфоцитов по экспрессии другого маркера – ядрышкового белка a3 [12]. Основными недостатками представленных методов являются сложность, трудоемкость и высокая стоимость их адаптации для оценки аллоиммунных взаимодействий по HLA.

Известно, что экспрессия HLA-DR – динамический процесс, связанный с активацией иммунокомпетентных клеток, в том числе и при аллоиммунных взаимодействиях [13]. Доказано, что уровень экспрессии HLA-DR на поверхности иммунокомпетентных клеток не ассоциирован с его синтезом, а его плотность может изменяться в течение суток [14]. На основании этого нами был разработан метод оценки аллоиммунного ответа при трансплантации почки по уровню изменения экспрессии HLA-DR, детектированному с помощью проточной цитофлуориметрии на лимфоцитах после инкубации в среде с донорским лимфоцитарным антигенным диагностикумом.

Использование лимфоцитарной взвеси, приготовленной из региональных лимфатических узлов донора, содержащей высокое количество антигенного материала (молекул HLA) как I класса (CD3⁺-лимфоциты), так и В-лимфоцитов (CD19⁺), экспрессирующих HLA II класса, является доступной и простой методикой получения антигенного диагностикума. Материалом для его получения являются регионарные лимфатические узлы, которые на этапе подготовки органа к пересадке, как правило, присутствуют и без труда выделяются из донорского материала.

Данная манипуляция проводится в организации здравоохранения, где осуществляется трансплантация почки реципиенту, и не требует дополнительных манипуляций по заготовке материала во время операции эксплантации органов с дополнительной организацией транспортировки.

Оценка аллогенного иммунного ответа на раннем этапе позволит своевременно вносить необходимые изменения в иммуносупрессивную терапию пациентов с учетом вида диагностированного иммунологического риска.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом выполненного исследования является оценка аллогенного иммунного ответа реципиента по уровню изменения экспрессии HLA-DR, детектированному с помощью проточной цитофлуориметрии на лимфоцитах после их инкубации в среде с донорским лимфоцитарным диагностикумом, полученным из лимфатических узлов донора и содержащим антигены главного комплекса гистосовместимости I и II классов.

Предлагаемый способ получения антигенного диагностикума прост в воспроизведении, что допускает его применение в организации, непосредственно осуществляющей трансплантацию почки. Результаты оценки характера специфического иммунного ответа пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации могут быть использованы для коррекции иммуносупрессивной терапии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Curtoni E.S., Magistrone P., Fasano M.E., Pratico L., Roggero S. (1999) Waiting list for kidney transplant. Some patients wait too long. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 13, no 1, pp. 37–41.
2. Zachary A. (1990) ASHI Laboratory Manual, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. 2 nd, NY, pp. 307–20.
3. Gibney E.M., Cagle L.R., Freed B., Warnell S.E., Chan L., Wiseman A.C. (2006) Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant*, vol. 21, no 9, pp. 2625–9.
4. Abramov V. (2006) Ocenka biologicheskoy sovместимости donora i recipienta pri transplantacii pochki [Assessment of biological compatibility of donor and recipient in kidney transplantation]. Posobie dlya vrachej [Guide for physicians]. M., pp. 29–35.
5. Novikov D. Novikov P. (2006) *Klinicheskaya immunopatologiya* [Clinical immunopathology]. M. (in Russian).
6. Shpakova A., Bulycheva T., Golovkina L., Kut'ina R., Pushkina T., Hasigova B., Lyubimova L., Kuz'mina L. (2012) Reakciya smeshannoj kul'tury limfocitov – MLC i genotipicheskaya znachimost' ee proliferativnogo otveta pri podbore HLA-identichnogo donora sibsа dlya transplantacii kostnogo mozga (itogi 30-letnej raboty) [Reaction of mixed lymphocyte culture – MLC and genotypic significance of its proliferative response in the selection of HLA-identical donor sibs for bone marrow transplantation (results of 30-year work)]. *Gematologiya i transfuziologiya*, vol 3, pp. 13–21.
7. Stella A., Van Belle K., De Jonghe S., Louat T., Herman J., Rozenski J., Waer M., Herdewijn P. (2012) Synthesis of a 2,4,6-trisubstituted 5-cyano-pyrimidine library and evaluation of its immunosuppressive activity in a Mixed Lymphocyte Reaction assay. *Bioorg Med Chem*, vol. 21, no 5, pp. 1209–18.
8. Junyi Z., Weifeng H., Gaoxing L., Jun Wu. (2014) Mixed lymphocyte reaction induced by multiple alloantigens and the role for IL-10 in proliferation inhibition. *Burns & Trauma*, vol. 2, pp. 24–28.
9. Hubutiya M., Borovkova N., Doronina N., Shmarina N., Storozhev R., Chudakova L. (2013) Opredelenie antileikocitarnyh donor-spezificheskikh antitel v rannem posttransplantacionnom periode [Definition of antileukocyte donor-specific antibodies in the early post-transplantation period]. *Molekulyarnaya medicina*, vol. 2, pp. 38–41.
10. Korol'kova O., Senyukov V., Kozhevnikov B. (2009) Ekspressiya ergotop-associirovannykh markerov aktivirovannyimi T-limfocitami [Expression of ergotop-associated markers by activated T-lymphocytes]. *Medicinskaya Immunologiya*, vol. 11, no 2–3, pp. 256–260.
11. Dejneko N., Bulycheva T., Grigor'ev A., Kovrigina A., Vol'pina O., Vladimirova N. (2014) Immunocitohimicheskaya identifikaciya monomernyh i oligomernyh form belka v23/nukleofozmina v limfoidnykh kletkah u bol'nykh s razlichnymi limfoproliferativnymi zabolevaniyami [Immunocytochemical identification of monomeric and oligomeric forms of B23 protein/nucleophosmin in lymphoid cells in patients with various lymphoproliferative diseases]. *Immunologiya*, vol. 2, pp. 68–72.
12. Dejneko N., Bulycheva T., Kovrigina A., Grigor'ev A. (2014) Ekspressiya novogo a3 antigena v kletkah bol'nykh s razlichnymi limfoproliferativnymi zabolevaniyami [Expression of new A3 antigen in cells of patients with various lymphoproliferative diseases]. *Medicinskaya immunologiya*, vol. 16, no 5, pp. 437–442.
13. Sambur M. (1991) Sposob ocenki vzaimodejstviya limfocitov in vitro, osnovannyj na opredelenii ih rozetkoobrazuyushchej sposobnosti [Method of assessment of the interaction of lymphocytes in vitro, based on determination of their rosette-forming ability]. *Immunologiya*, vol. 2, pp. 30–33.
14. Yarilin A. (2010) *Immunologiya* [Immunology]. M: GEOTAR-Media. (in Russian)

Поступила/Received: 11.10.2019

Контакты/Contacts: zyb-svetlana@yandex.ru

Алексинская О.А.¹, Алексинский В.С.², Зиновкин Д.А.³, Шпак А.В.⁴, Хейдорова Е.Э.⁴, Дебелый М.А.⁵

¹ Независимый исследователь, Варшава, Польша

² Специализированная клиника Нойкирхен, Нойкирхен байм Хайлиген Блут, Германия

³ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

⁴ Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь

⁵ Фрибургский университет, Фрибург, Швейцария

Aliaksinskaya V.¹, Aliaksinski V.², Zinovkin D.³, Shpak A.⁴, Kheidorova E.⁴, Debely M.⁵

¹ Independent Researcher, Warsaw, Poland

² Special Clinic Neukirchen, Neukirchen beim Heiligen Blut, Germany

³ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

⁴ Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

⁵ University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

Мозырская «чупакабра» – что говорит наука?

Mozyr "Chupacabra" – what does Science Say?

Резюме

Введение. В последние годы легенда о сверхъестественном хищнике чупакабре, возникшая в 50-х гг. в Америке, глубоко проникла на территорию Беларуси. Появление ее вызвано участвовавшими нападениями неизвестного хищника на домашние хозяйства. До недавнего времени оставалось неясным, кем является белорусская «чупакабра» на самом деле, но в 2017 г. на месте нападения «чупакабры» в Мозырском районе нам удалось получить образцы шерсти этого животного.

Цель. Определить видовую принадлежность мозырской «чупакабры» с использованием современных методов молекулярно-биологического исследования.

Материалы и методы. Изучалась морфология следов, оставленных «чупакаброй», выполнялась просвечивающая, темнопольная и фазово-контрастная микроскопия волос. Проводился генетический анализ митохондриальной ДНК волосяных фолликулов хищника.

Результаты и обсуждение. Следы, оставленные «чупакаброй», морфологически могут быть идентифицированы как собачьи или волчьи. Световая микроскопия волос животного указала на то, что с наибольшей вероятностью шерсть принадлежала собаке, а ПЦР-анализ митохондриальной ДНК показал высокую степень идентичности (96,14%) нуклеотидной последовательности участка митохондриального гена *cytb* соответствующим участкам вида *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 (собака домашняя). Сопоставление полученных результатов с уже имеющимися данными о других подобных нападениях на домашние хозяйства в Беларуси позволяет предполагать, что виновником всех подобных инцидентов является гибридная особь собаки и волка – волкособ.

Выводы. Так называемая мозырская чупакабра является представителем семейства Canidae – *Canis lupus familiaris*, или собака домашняя, наиболее вероятно, к подобным нападениям причастны дикие волкособы. При анализе подобных инцидентов наиболее информативным методом является ПЦР-анализ митохондриальной ДНК шерсти животного, а анализ следов и световая микроскопия служат скорее ориентировочным методом. Выполненное нами

исследование к тому же показало, что имеющиеся методы современной лабораторной диагностики могут быть успешно использованы для изучения подобного рода случаев.

Ключевые слова: чупакабра, Беларусь, микроскопия волос, ПЦР-анализ, митохондриальная ДНК, Canidae, волкособ.

Abstract

Introduction. In recent years, the legend about a supernatural predator chupacabra, which was appeared in the 1950s in America, has penetrated deeply into the territory of Belarus. Its appearance is caused by the increased frequency of attacks on households by an unknown predator. Until recently, it remained unclear what was the Belarusian "chupacabra" in fact, but in 2017, at the site of the attack of the "chupacabra" in Mozyr district, we managed to obtain the samples of this animal's wool.

Purpose. To determine the species of Mozyr "chupacabra".

Materials and methods. The morphology of traces left by the "chupacabra" was studied. Translucent, dark-field and phase-contrast hair microscopy was performed. Genetic analysis of mitochondrial DNA of hair follicles of predator was carried out.

Results and discussion. The traces left by the Chupacabra can be morphologically identified as dog or wolf. Light microscopy of the animal fur indicated that most likely it was the hair of the dog. PCR-analysis of mitochondrial DNA showed a high degree of identity (96.14%) of the nucleotide sequence of the cytb mitochondrial gene section corresponding to the *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 (domestic dog). Comparison of the obtained results with the already available data on other similar attacks on households in Belarus lets to suggest that the "culprit" of all such incidents is a hybrid dog and wolf – a wolf-dog.

Conclusions. The so-called Mozyr "chupacabra" is a representative of the family Canidae – *Canis lupus familiaris*, or a domestic dog. Most likely, wild wolfhounds are involved in such attacks. PCR analysis of the animal's mitochondrial DNA wool is the most informative method for analyzing such incidents; trace analysis and light microscopy are more of an indicative method. Our research showed that the available methods of modern laboratory diagnostics can be successfully used to study such cases.

Keywords: chupacabra, Belarus, hair microscopy, PCR-analysis, mitochondrial DNA, Canidae, wolfhound.

■ ВВЕДЕНИЕ

В 2017 г. 30 июня «Телеканал Мозырь» сообщил о том, что «в Мозырском районе объявилась чупакабра». Жертвой таинственного существа стало домашнее хозяйство Светланы Цирельчук. Как сообщал телеканал, «через двухметровый забор что-то проникло на территорию ее участка и убило почти сотню уток и кур-бройлеров. Неизвестное существо с невероятным аппетитом на чужой территории вело себя по-хозяйски и действовало весьма коварно. Не смогло пробраться в курятник через дверь, которая, кстати, вся в следах от когтей, додумалось проникнуть через приоткрытую форточку. Сетка разодрана, как капроновые колготки. Почти 50 упитанных бройлеров не утолили его голод, и оно отправилось к пруду, где были утки». Вскоре происшествие получило достаточно широкий резонанс в массмедиа, и спустя буквально 10 дней телеканал СТВ опубликовал более подробный репортаж, в котором некие «криптозоологи» также винили в произошедшем таинственную чупакабру.

Хорошим подкреплением мифу о мозырской «чупакабре» послужило и то, что специалисты не смогли дать удовлетворительное объяснение произошедшему. Дмитрий Цык, государственный инспектор Мозырской межрайонной Государственной инспекции охраны животного и растительного мира при Президенте Республики Беларусь, уверил, что «этот вред причинил лесной хорек. Являясь хищником достаточно агрессивным и дерзким, он осознает, что добычу он свою не вытянет и съесть не сможет, но все равно, основываясь на инстинктах, способен убить достаточное количество птиц». С ним согласился и начальник Мозырского отдела районной инспекции природных ресурсов и охраны окружающей среды Юрий Зборовский. Однако высказанная специалистами версия о проделках хорька не была принята людьми, так как, по мнению пострадавших, имела мало общего с реальностью. «Там, наверно, лапы огромные и киптюры большие, чтобы все это разодрать с такой силой, зверством. Ну ладно, разодрал одну клетку, а зачем вторую? А зачем еще две? Всех покусать, в кучу сложить и кровь выпить», – говорила Светлана Цирельчук.

Журналисты при этом подчеркивают, что «следы, которые оставил ненасытный убийца, свидетельствуют о гораздо больших размерах». Как сообщал «Телеканал Мозырь» далее, «все это порождает страх у Светланы Андреевны и ее семьи. А вдруг оно вернется, ведь здесь еще осталось чем поживиться» [1, 2].

Легенда о чупакабре возникла в 50-х гг. в Америке, где ее «наблюдали» в различных регионах Пуэрто-Рико, Бразилии, Чили, Мексики и Соединенных Штатов, и уже в 90-х гг. чупакабра как мифологический персонаж превзошла по популярности снежного человека и лох-несское чудовище [3], в англоязычном интернет-пространстве функционирует даже страница, посвященная чупакабре, www.elchupacabra.com.

На сегодняшний день чупакабра глубоко «проникла» также и на территорию Беларуси, России и Украины, ее начали упоминать в своих работах отечественные фольклористы [4].

Однако порой некоторые проблемы, требующие изучения с применением современных методов научного познания, в том числе и методов лабораторной диагностики, остаются в плоскости суеверий и отдаются на откуп собирателям фольклора, хотя при этом, казалось бы, они вполне доступны исследованию. Так, 1 ноября 2007 г. новостная служба университета Техаса сообщила о том, что биологам государственного техасского университета в Сан-Маркосе удалось раскрыть тайну нападения чупакабры в небольшом городке Южного Техаса Куэро – сверхъестественный хищник оказался койотом. Анализ D-петли митохондриальной ДНК методом полимеразной цепной реакции с использованием автоматизированного ДНК-секвенсора Beckman Coulter (полученная последовательность идентифицировалась при помощи базы данных GENBANK) показал, что «последовательность ДНК практически идентична ДНК койота (*Canis latrans*)». Проведение анализа стало возможным только благодаря тому, что владелец ранчо Филлис Канион, обнаружив мертвое животное, сохранил его голову в морозильной камере. Руководитель исследования сотрудник кафедры биологии Майк Форстнер при этом отмечает: «не часто у нас есть генетический материал от животного, связанного с легендарным мифом. Как правило, единственное

доступное свидетельство представлено размытыми фотографиями, видеозаписями при слабом освещении или другими, не подлежащими проверке доказательствами» [5].

К сожалению, подобного рода примеры успешной работы по идентификации видовой принадлежности таинственного хищника единичны. На территории стран СНГ подобные работы отсутствуют, хотя при этом сообщения о нападениях чупакабры имеют огромный общественный резонанс, так как нападения на домашние хозяйства по-прежнему продолжают. Из наиболее шумевших за последние годы в прессе (помимо уже упомянутого инцидента в Мозыре) можно отметить следующие.

Октябрь 2010 г., г. п. Старобин Солигорского района Минской области: таинственное существо уничтожило фактически всех кур, кроликов и уток в поселке, счет уничтоженного поголовья птиц шел на тысячи, были уничтожены даже коты и совершено нападение на свиней (при этом хищник проломил дверь хлева (!)), «все столы в местной администрации [были] буквально завалены письмами и коллективными обращениями напуганных людей». Интересны версии, которые были высказаны специалистами в этом случае: председатель Старобинского сельсовета назвала зверя «так называемая чупакабра», зам. главного ветеринарного врача Солигорского района посчитал, что это рысь, а директор учреждения «Лидская районная организационная структура» ООО «Белорусская организация охотников и рыболовов» – что это лисица обыкновенная, по словам доцента кафедры зоологии Государственной академии ветеринарной медицины, в Старобине зверствовал представитель семейства кунных (хорек). При этом версия о том, что к нападениям причастны стаи бездомных собак, отвергалась как маловероятная, специалист-кинолог одного из минских клубов заявил, что «собаки не будут душить кроликов в таких количествах. <...> Если же собака бродячая, то придет за добычей, чтобы поесть. <...> Много кроликов убивать она не станет – одного-двух, чтобы насытиться» [6, 7].

Май 2017 г., г. Ганцевичи Брестской области: неизвестный хищник, прозванный «ганцевичской чупакаброй», совершил нападение в разных точках города, при этом пробирался через металлическую сетку и прогрызал доски, на месте главного «куриного побоища» найдено более 90 трупов домашней птицы. Власть высказали предположение о том, что «курицу «порезали» бродячие псы», население города, однако, считает, что «власти города скрывают, что на улицах орудует неизвестное существо, а собаки – лишь придуманная легенда» [8].

Осень 2017 г. – май 2018 г., г. Калинковичи Гомельской области: в городе объявился «какой-то монстр, который уничтожает кроликов и крушит все на своем пути». Счет поголовья шел на десятки. Примечательно, что в этом случае хищника не только один раз видели – он оказался большой черно-белой собакой, которая «почуввав опасность, взбежала по сетке (!), с разгону выбила несколько жердей в соседском заборе и была такова» – но и в конце концов застрелили. Тем не менее, несмотря на столь прозаическую разгадку тайны, люди были крайне обеспокоены: «если это и собака, то она какой-то мутант: перепрыгивает заборы, разрывает металлические решетки, отгибает гвозди! Она и по крышам клеток ходит, делает подкопы под забором. Это какой-то террорист!» [9–11].

Август 2018 г., агрогородок Деревная Слонимского района Гродненской области и соседние деревни: неизвестный зверь – «может, волк, а может, и чупакабра» – устроил самый настоящий террор: «разорвал телят с местной фермы», совершил нападения на деревенские подворья, где покалечил собак (от одного из животных остались лишь голова и передние лапы (!)), как писали массмедиа, «сельчане боятся не только за живность, но за жизнь и безопасность детей» [12, 13]. Несколько позже пресса сообщила: «стопроцентно известно, что на Слонимщине орудует волк», сопроводив ремаркой, что для доказательства причастности этого хищника к нападениям «потребуется провести ряд экспертиз, в том числе генетическую» [14]. Однако была ли проведена экспертиза и каковы ее результаты, осталось неизвестным.

Как можно видеть, все инциденты, связанные с «чупакаброй», протекают однотипно и имеют общие черты:

- 1) хищник характеризуется как невероятно сильный, коварный и неуловимый зверь;
- 2) наносит огромный урон домашним хозяйствам;
- 3) идентифицировать хищника чаще не удается;
- 4) появление его сопровождается атмосферой страха и террора.

По последнему пункту следует отдельно подчеркнуть, что даже, казалось бы, надежная идентификация животного в Калинковичах оставила население города в состоянии страха и недоверия. Вероятно, объясняется это отсутствием у населения твердой уверенности в том, что уничтожен был именно тот самый зверь, а не случайная собака.

Именно поэтому точная идентификация животного в каждом подобном случае с применением современных методов лабораторной диагностики представляется нам крайне важной. По словам уже упомянутого Майка Форстнера, «раз люди обеспокоены чупакаброй, возможно, становится еще более важным, чтобы мы объяснили тайну. Люди могут испытывать страх перед тем, чего не понимают, и объяснение мира природы является одной из важнейших целей науки» [5].

Случай в Мозыре предоставил нам хорошую возможность получить образцы шерсти на месте нападения «чупакабры» в Беларуси: 03.07.2017 Алексинской О.А. был произведен экспедиционный выезд в д. Бибики Мозырского района, на дачный участок Светланы Цирельчук. Осмотр участка и беседа с хозяевами показали, что происшествие было отражено средствами массовой информации корректно. Были собраны образцы шерсти животного. В дополнение к уже сообщенной СМИ информации стоит лишь отдельно отметить, что животное без труда перемахнуло через гладкий двухметровый бетонный столб (об этом говорили дорожки следов и оставленные на столбе следы когтей), чтобы проникнуть на дачный участок.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить видовую принадлежность мозырской «чупакабры» с использованием современных методов молекулярно-биологического исследования.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве ориентировочного метода мы изучили морфологию следа, оставленного животным на мягком грунте огорода. Так как к моменту экспедиционного выезда в Бибики следы уже были размыты дождем, мы использовали фотографии, сделанные хозяевами. Для определения видовой принадлежности следов использовался идентификатор следов Лобергского зоопарка, Верхняя Бавария, Германия*.

Собранная на месте нападения «чупакабры» шерсть подвергалась просвечивающей, темнопольной и фазово-контрастной световой микроскопии на различных увеличениях при помощи микроскопа Nikon Eclipse 50i, микрофотографии волос выполнялись фотокамерой DF-S1 с использованием пакета программ NiS-elements. Морфология волоса сравнивалась с образцами шерсти животных, представленными в электронной базе данных Alaska Fur ID Project [15].

Генетический анализ ДНК волосяных фолликулов данной особи был проведен в лаборатории молекулярной зоологии ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» в рамках комплексных исследований, посвященных молекулярно-генетической идентификации млекопитающих с неясной видовой принадлежностью.

Выделение ДНК из шерсти проводили с помощью коммерческого набора NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany) по протоколу производителя. Участок гена цитохрома b (более 400 п.н.) амплифицировали с использованием универсальных праймеров MVZ04 (5'-GCAGC CCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3') и MVZ05 (5'-CGAAGCTTGATGAAAAA CCATCGTTG-3'), рекомендованных для изучения млекопитающих [16]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x Taq-буфер, 3,0 mM MgCl₂, 1x dNTPs, 1U Taq-полимеразы (использованные реактивы произведены ОДО «Прайм-тех», Беларусь), в амплификаторе модели CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) с использованием следующего режима: предварительная денатурация – 94 °C, 3 мин., затем 40 циклов денатурации (94 °C, 1 мин.), отжига (45 °C, 1 мин.) и удлинения цепи (72 °C, 1 мин.) с последующей заключительной достройкой цепи (72 °C, 4 мин.). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Cleanup (Macherey-Nagel, Germany) и секвенировали с использованием GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, Germany) и системы генетического анализа GenomeLAB GEXP (Beckman Coulter, Germany).

Полученные нуклеотидные последовательности участка целевого гена были обработаны при помощи встроенного сервиса BLAST программы MEGA 6.0, позволяющего посредством статистического анализа установить степень подобия полученных нами последовательностей с расположенными в международной базе GenBank и таким образом достоверно определить их видовую принадлежность.

* Bayerwald-Tierpark Lohberg, оф. сайт зоопарка <https://www.bayerwald-tierpark.de>

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Следы, изображенные на предоставленных хозяевами фотографиях, морфологически могут быть идентифицированы как следы, оставленные собакой (одной или несколькими) или, учитывая мягкий грунт, волком (рис. 1). Оценить размеры следов по имеющимся фотоснимкам, к сожалению, оказалось невозможным из-за отсутствия на них ориентиров для калибровки, например, линейки.

Шерсть, собранная в разных местах дачного участка (цементный газ и помещение с клетками), оказалась идентичной и была представлена остевыми и пуховыми волосами белого, беловато-серого цвета. Оптический край волос преимущественно мелкозубчатый с достаточно равномерным расположением зубцов. Кутикула представлена узким сероватым тяжем, кое-где не видна вовсе, согласно А. Северцовой и О. Черновой [17], некольцевидная, прилегающая, неинвертированная, черепичная. Чешуйки скорее лепестковидные, плотно прилегают на остевых волосах, дистальный край чешуек приподнятый, зерна пигмента не определяются. Корковое вещество бесцветное, содержит единичные гранулы пигмента, возможно, артефициального происхождения. Медулла остевых волос была непрерывной, медулла же пуховых волос была вакуольного типа с лестничным паттерном распределения воздушных ячеек, напоминающих стопку сложенных клиньев. Медулярный индекс остевых и пуховых волос составил 0,48–0,5 и 0,37–0,38 соответственно.

По данным морфологическим признакам шерсть «чупакабры» ближе всего к шерсти собаки или волка, сравнительная характеристика волос по наиболее важным для видовой идентификации параметрам методом световой микроскопии приведена в таблице. Провести, однако, точную дифференцировку между этими двумя видами достаточно сложно: считается, что волк имеет предположительно более длинные пуховые волосы, чем прочие представители семейства псовых, а мех немецкой овчарки на ощупь более мягкий, чем мех волков, койотов или

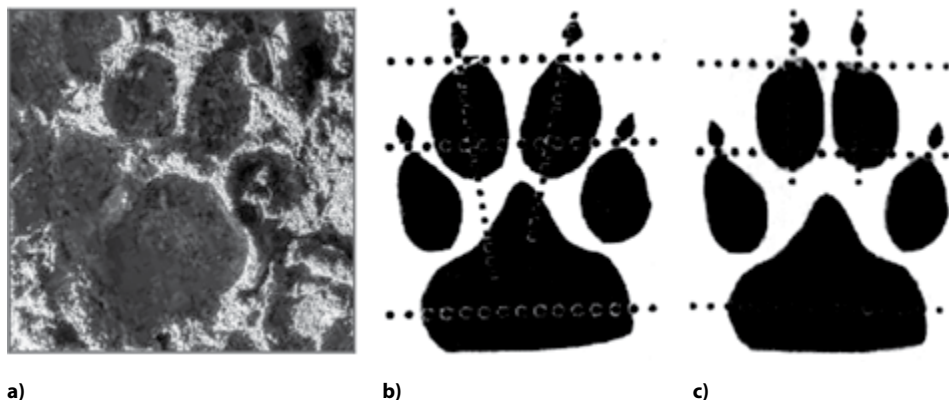


Рис. 1. а) след, оставленный мозырской «чупакаброй»; б, с) морфология следа собаки и волка соответственно по данным идентификатора следов животных Лобергского зоопарка, Германия

Сравнительная характеристика микроскопических признаков волос волка, собаки и мозырской «чупакабры»

Животное	Морфологические характеристики							
	остевой волос				пуховой волос			
	D, мкм	MI	медулла	кутикула	D, мкм	MI	медулла	кутикула
Собака*	60–228	0,42–0,69	Непрерывная или отсутствует	Лепестковидные чешуйки немного приподняты по краям	28–100	0,35–0,45	Вакуольного типа, ячейки в виде сложенных клиньев	Чешуйки немного приподняты по краям
Волк*	35–228	0,45–0,85	Непрерывная, крайне редко отсутствует	Широко расставленные лепестковидные чешуйки	10–100	0,48–0,55	Ячейки по типу однорядной лестницы	Чешуйки коронального типа с длинными лепестками
Мозырская «чупакабра»	90–210	0,48–0,5	Непрерывная	Плотно прилегающие лепестковидные чешуйки, едва приподнятый дистальный край	35–90	0,37–0,38	Вакуольного типа, лестничный паттерн, ячейки в виде сложенных клиньев	Лепестковидные чешуйки, приподнятый дистальный край

Примечание: * по данным электронной базы данных Alaska Fur ID Project [15].

гибридных особей, кроме того, направляющие волосы волка характеризуются относительной стабильностью параметров средней толщины в зависимости от топического участка и слабо выраженным различием волос по толщине у животных различных возрастных групп [15, 18], но в нашем случае эти отличительные признаки не имеют никакого вспомогательного значения для точной идентификации вида животного.

Гораздо лучший результат дало визуальное сравнение с микрофотографиями образцов шерсти, представленных в электронной базе данных Alaska Fur ID Project: полученный нами материал с большей вероятностью можно идентифицировать с шерстью, принадлежавшей собаке (рис. 2, 3).

Тем не менее результаты микроскопического исследования волос следует рассматривать с некоторой долей критики, так как вопросы создания единой унифицированной системы терминологии и классификации основных микроструктур волоса на сегодняшний день все еще активно прорабатываются и применение микроскопического исследования шерсти для видовой идентификации животного пока еще не может служить достоверным методом. Даже в пределах одного вида, например, собаки, морфология волоса может сильно варьировать в зависимости от половозрастной принадлежности и породы животного, а также от конкретного участка волосяного покрова [17, 18]. Поэтому наиболее релевантными представляются нам результаты ПЦР-анализа ДНК волосяных фолликулов «чупакабры». Обработка, проведенная путем подбора консенсусных значений таких параметров, как Max. Score, Total

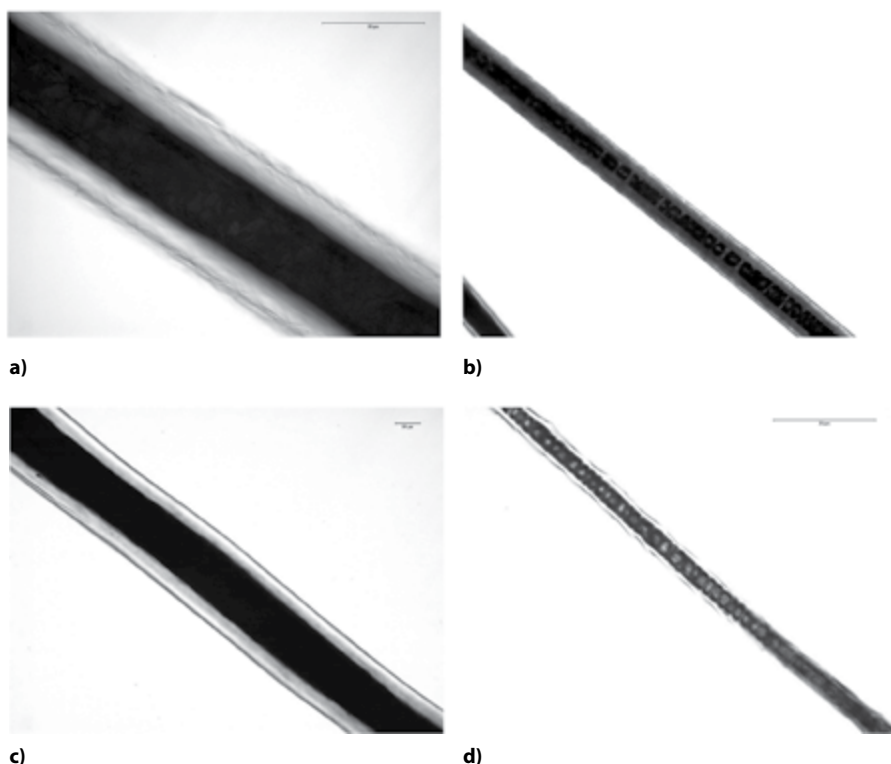


Рис. 2. Просвечивающая микроскопия: а) остевого волоса собаки (400х); б) пухового волоса собаки (400х); с) остевого волоса волка (200х); d) пухового волоса волка (200х) по данным Alaska Fur ID Project [15]

Score, Query Cover, E-value, Per. Ident., показала высокую степень идентичности (96,14%) полученной нами нуклеотидной последовательности соответствующим участкам гена вида *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 (собака домашняя) (рис. 4).

Как можно видеть, анализ митохондриальной ДНК не только полностью подтверждает данные оценки следов и шерсти, но и дает точные данные о видовой принадлежности исследуемой особи. Можно с высокой степенью достоверности утверждать, что «сверхъестественное существо чупакабра», совершившее нападение на дачный участок в Мозыре, является собакой.

Породу животного установить, к сожалению, невозможно, но судя по объемам и характеру причиненных разрушений, мы имеем дело с необычайно крупной особью, а поведение ее указывает на то, что это не домашний пес, а скорее всего, дикий. Митохондриальная ДНК наследуется по материнской линии, поэтому нельзя исключать причастность к подобным инцидентам и гибридных особей – волкособов.

Косвенно подтверждает этот факт сообщение старшего егеря Калининковского лесхоза Виталия Садовского, который выследил и застрелил

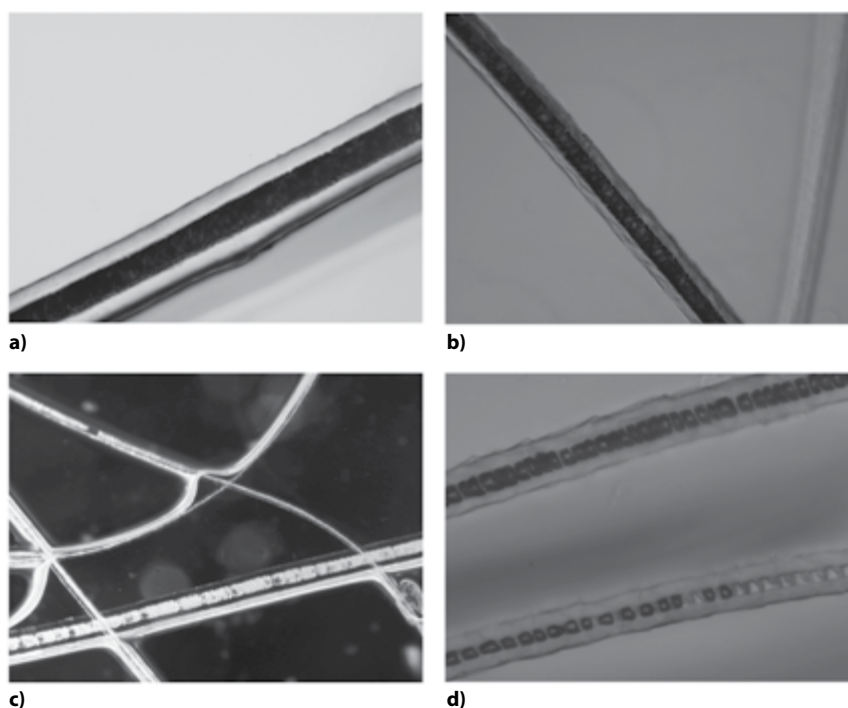


Рис. 3. Микроскопия шерсти мозырской «чупакабры»: а) остиевой волос (просвечивающая микроскопия, об. 20х); б, с) пуховой волос (фазово-контрастная микроскопия, об. 20х и 40х соотв.); д) пуховой волос (просвечивающая микроскопия, об. 40х)

Калинковичскую «чупакабру»: «собака, действительно, не совсем обычная... крупная, с большими зубами. Окрас шерсти серо-коричневый, немного похожа на шакала. Но это точно не чупакабра» [10].

Уже в 2014 г. (примерно через 4 года после одного из самых ранних сообщений в прессе о «чупакабре» в п. Старобин) белорусские охотники добыли несколько гибридных особей в Россонском районе и в связи со сложностью идентификации животного обратились в лабораторию териологии НПЦ по биоресурсам НАН Республики Беларусь. А уже с 2016 г. белорусские ученые занялись прицельным изучением вопроса гибридизации. Как выяснилось, именно дикие собаки убивают животных из спортивного интереса, оставляя нетронутыми. Жертвами их в дикой природе могут стать олени, кабаны, зайцы и прочие лесные звери. Так, в 2015 г. охотниками за один день были найдены 16 косуль и 3 поросенка дикого кабана, убитых дикими собаками. Если в 2016 г. было еще не совсем ясно, унаследуют ли дикие волкособы способность не бояться людей и станут ли ближе подходить к человеку, то в 2017 г. в деревне Повитье Кобринского района стало совершенно очевидно, что «линия фронта» с просторов дикой природы переместилась к жилищу человека. С ноября 2016 г. в Повитье начали пропадать дворовые псы

Select: All None Selected 0

Alignments @Download @ GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate BORE-RR7296 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi11682117.47250M.1100247.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate 9810334 mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi114094805.1KX798513.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate 1381T_142b_Clade_1_China mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi122741893.1KX7959812.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate 1380T_142b2_Clade_1_China mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi122741890.1KX7959811.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate H010100 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi1132852007.1KX379529.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate CTC100 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi112952009.1KX379528.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Monoclia2 mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi1106490536.896383.2
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate 282135China mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi1106490567.896381.2
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Ala1 mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642713729k.896411.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can10 mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642713440k.896409.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can8 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642713320k.896408.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can9 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642713150k.896407.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can6 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642712880k.896405.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can5 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642712740k.896404.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can3 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642712460k.896402.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Can2 mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642712320k.896401.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Bulgaria mitochondrion, partial genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642712040k.896399.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Ukraine mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642711750k.896397.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Monoclia4 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642711480k.896395.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Monoclia3 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110642711340k.896394.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Iranan1012 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507988090k.844672.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Seanshiv012 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987950k.844670.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Chineseyi016 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987810k.844668.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Portugueseyi016 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987670k.844666.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Indian016 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987530k.844665.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Mexican016 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987390k.844664.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Mexican016 mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi110507987250k.844663.1
<input type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate 59H mitochondrion, complete genome	554	554	68%	1e-153	96.14%	gi1102933009790k.091094.1

Рис. 4. Статистический анализ с использованием сервиса BLAST (MEGA 6.0)

(уже в период по январь 2017 г. было убито 15–20 собак), а вскоре после этого был застрелен один из виновников происшествия – им оказался волкособ. Обращает на себя внимание совершенно одинаковый характер поведения хищников в Повитье – одно из животных без колебаний напролом прорвало ограждения, пробежало между стоящими охотниками и скрылось – и «чупакабры» в приведенных нами выше случаях. Как и в случаях с «чупакаброй», нападения волкособов в Повитье также сопровождалась атмосферой террора и паники среди местного населения: «сразу же наладили хорошее освещение на окраинах, доярок стали отвозить утром на работу. На собрании сказали родителям, чтобы детей сопровождали. Надо было успокоить людей» [19, 20].

Все эти данные вкупе с полученными нами результатами исследования шерсти с места нападения в деревне Бибики Мозырского района указывают на то, что белорусская «чупакабра» является дикой собакой, а точнее – гибридной особью собаки и волка, волкособом. Однако для проверки и доказательства этого в условиях лаборатории использованных нами методов недостаточно, что делает необходимым применение расширенных методов анализа волос, например, высокоразрешающей масс-спектропии белка.

■ ВЫВОДЫ

1. Показано, что так называемая мозырская чупакабра является представителем семейства Canidae – *Canis lupus familiaris*, или собака домашняя. Сопоставление с уже имеющимися данными о характере нападений и причастных к ним животных позволяет предполагать, что во всех случаях это была гибридная особь – волкособ, и все последующие нападения следует также связывать именно с этим животным.
2. При анализе подобных инцидентов наиболее информативным методом является ПЦР-анализ митохондриальной ДНК, полученной из собранной на месте нападения шерсти животного. Анализ следов, оставленных животным, и световая микроскопия волос могут быть использованы скорее как ориентировочный метод, в том числе, например, для выбора праймеров для ПЦР.
3. Наиболее ценным результатом данного исследования является наглядная демонстрация того факта, что имеющиеся методы современной лабораторной диагностики уже в настоящее время могут быть успешно использованы для изучения подобных случаев. Такой подход позволяет легко произвести междисциплинарный перевод проблемы из области мифологии и фольклора в область точного научного знания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Sinitskaya V., Peresipkin V., *Chupakabra ili horek? Kto zadushil kurits?* [Chupacabra or ferret? Who strangled the hens?]. TELEKANAL MOZIR' [TV channel Mozyr] (electronic resource). Available at: <http://tkm.by/2017/06/chupakabra-ili-xorek-kto-zadushil-kuric> (accessed 19.08.2019).
2. *100 rasterzannih domashnih ptits nashla dachnitsa v Mozire: kommentarii inspektora prirodoohrani* [100 torn poultry found by summer resident in Mozyr: comment of environmental inspectors]. 09.07.2017 – 15:42. Natsional'nii telekanal «Stolichnoe televidenie» [National TV channel "Capital TV"] (electronic resource). Available at: <http://www.ctv.by/okolo-sotni-domashnih-ptic-nashla-ubitymi-dachnica-v-mozyre> (accessed 19.08.2019).
3. Neer K. *How Chupacabras Work* (electronic resource). Available at: <https://science.howstuffworks.com/science-vs-myth/strange-creatures/chupacabra.htm> (accessed 19.08.2019).
4. Butov I., Gaiduchik V., Aleksinskii V. (2017) Rasskazi o sverh'estestvennom v sovremennih zapisyah belorusskogo fol'klora [Tales about the supernatural in contemporary notes of Belarusian folklore]. *ZHivaya starina*, vol. 2 (94), pp. 55–57.
5. Blaschke J. (2007) *Texas State researchers solve mystery of Cuero chupacabra*. University News Service. Texas State University (electronic resource). Available at: https://www.txstate.edu/news/news_releases/news_archive/2007/11/Chupacabra110107.html (accessed 19.08.2019).
6. *Legendi o chupakabre: kto ubil vseh kur i krolikov v posyolke Starobin?* [Legends of chupacabra: who killed all the chickens and rabbits in the Starobin village?] October 08, 2012, 20:40. Obschenatsional'noe televidenie [Nationwide television] (electronic resource). Available at: <https://ont.by/news/0080265> (accessed 19.08.2019).
7. *Poka s chupakabroi srazhayutsya pod Minskom, ona oruduet na severe Belarusi* [While fighting the Chupacabra near Minsk, it operates in the north of Belarus]. 15.10.2012 – 10:31. Natsional'nii telekanal «Stolichnoe televidenie» [National TV channel "Capital TV"] (electronic resource). Available at: <http://www.ctv.by/novosti-minska-i-minskoy-oblasti/zhiteli-soligorskogo-rayona-ishchut-spaseniya-ot-chupakabry> (accessed 19.08.2019).

8. Sosnovskaya O., Tur I. *Po sledam «chupakabri»: kto unichtozhaet kur na podvor'yah Gantsevichei?* [In the footsteps of "Chupacabra": who destroys chickens on the farmsteads of Gantsevichi?] May 16, 2017, 20:35. Obschenatsional'noe televidenie [Nationwide television] (electronic resource). Available at: <https://ont.by/news/po-sledam-chupakabri-kto-ynichtozhaet-kyr-na-podvoryah-gancevichej> (accessed 19.08.2019).
9. Kapitan T. *V Kalinkovichah oruduet chupakabra? Neizvestnii zver' unichtozhil desyatki krolikov na podvor'yah gorozhan* [Is chupacabra working in Kalinkovichi? An unknown beast destroyed dozens of rabbits in the courtyards of the townspeople]. 17.05.2018. Raionnaya gazeta "Kalinkavitskiya navini" [District newspaper "Kalinkavitskiya Naviny"] (electronic resource). Available at: <http://www.knews.by/?p=46001> (accessed 19.08.2019).
10. Kapitan T. *CHupakabra unichtozhena?..* [Is Chupacabra destroyed?..]. 25.05.2018. Raionnaya gazeta "Kalinkavitskiya navini" [District newspaper "Kalinkavitskiya Naviny"] (electronic resource). Available at: <http://www.knews.by/?p=46263> (accessed 19.08.2019).
11. Kapitan T. *Vinovata ne chupakabra, a brodyachie psi* [It's not the chupacabra who is to blame, but the stray dogs]. 27.08.2018. Raionnaya gazeta "Kalinkavitskiya navini" [District newspaper "Kalinkavitskiya Naviny"] (electronic resource). Available at: <http://www.knews.by/?p=49639> (accessed 19.08.2019).
12. *CHupakabra? V Slonimskom raione neizvestnoe zivotnoe napadaet na domashnii skot i pitomtsev* [Chupacabra? In Slonim district unknown animal attacks livestock and pets] August 17, 2018 at 10:44. TUT. BY – Belorusskii portal [TUT.BY – Belarusian portal] (electronic resource). Available at: <https://news.tut.by/society/604820.html> (accessed 19.08.2019).
13. Butovich N. «*Ot sobaki ostalis' tol'ko golova i perednie lapi*»: *v derevne pod Slonimom sel'chan izvodit neizvestnii zver'. Mozhet, volk, a mozhet, i chupakabra* [video] ["Only the head and forepaws were left of the dog": an unknown beast harasses the villagers in a village near Slonim. Maybe a wolf, or maybe a chupacabra [video]]. Komsomol'skaya pravda. Belarus' [Komsomolskaya Pravda. Belarus] (electronic resource). Available at: <https://www.kp.by/online/news/3207207> (accessed 19.08.2019).
14. Kozirev V. *V Slonimskom raione ubili ogromnogo volka. Vozmozhno, eto ta samaya «chupakabra»* [In Slonim district, a huge wolf was killed. Perhaps this is that very "chupacabra"]. SB.BY BELARUS' SEGODNYA [BELARUS TODAY] (electronic resource). Available at: <https://www.sb.by/articles/v-slonimskom-rayone-ubili-ogromnogo-volka-vozmozhno-eto-ta-samaya-chupakabra.html> (accessed 19.08.2019).
15. *Alaska Fur ID Project* (electronic resource). Available at: <https://alaskafurid.wordpress.com> (accessed 19.08.2019).
16. Smith M., Thomas W., Patton J. (1992) Mitochondrial DNA-like sequences in the nuclear genome of an akodontine rodent. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 9 (2), pp. 204–15.
17. Severtsova A., Chernova O. (2003) *Arhitektonika volos i ee diagnosticheskoe znachenie. Vipusk 3. Teoreticheskie osnovi sovremennih metodov ekspertnogo issledovaniya (Posobie dlya ekspertov, sledovatelei i sudei)* [Hair Architectonics and its Diagnostic Importance. Issue 3. Theoretical Foundations of Modern Methods of Expert Research (A Handbook for Experts, Investigators and Judges)]. Moscow: Russian Federal Center for Forensic Expertise (in Russian).
18. Slesarenko N., Podlesnih E. (2018) Morfologicheskie kriterii Tipologicheskoi identifikatsii volos u Canidae [Morphological criteria of typological identification of hair in Canidae]. *ZHurnal "Veterinariya i kormlenie"*, vol. 1, pp. 32–33.
19. Vasilishina YU. *V Belarusi poyavilis' "volkosobi". Volk v sobach'ei shkure* ["Wolfhounds" appeared in Belarus. Wolf in dog's clothing]. SB.BY BELARUS' SEGODNYA [BELARUS TODAY] (electronic resource). Available at: <https://www.sb.by/articles/volk-v-sobachey-shkure.html> (accessed 19.08.2019).
20. Volkovskaya E., Kupryakov A. *CHelovek volku – volk? Chto privelo k panike v derevne Povit'e* [Is the man a wolf for a wolf? What caused the panic in the village of Povitye]. ZYALĒNI PARTAL TAVARISTVA «ZYALĒNAYA SETKA» [GREEN PORTAL of the Fellowship "Green Network"] (electronic resource). Available at: <http://greenbelarus.info/articles/25-01-2017/chelovek-volku-volk-chto-privelo-k-panike-v-derevne-povite> (accessed 19.08.2019).

Поступила/Received: 21.08.2019

Контакты/Contacts: tarasenko.volha@gmail.com, aleksinski.w.s@gmail.com, zinych007@yandex.ru, mykhaylo.debelyy@unifr.ch, shpak.dvergr@gmail.com

Внелабораторный анализ: современные технологии сухой химии в практике лабораторного исследования вне стационарной клиничко-диагностической лаборатории

В последние годы внимание специалистов клинической лабораторной диагностики, врачей общей практики, терапевтов, хирургов и представителей других областей медицины все больше привлекает возможность реализации лабораторных исследований «Point of care testing – ПОСТ» – «анализ по месту оказания медицинской помощи». Подтверждением этому служит в том числе принятие утвержденной в рамках Союзного государства (Россия – Беларусь) программы «ЛАБТЕХ» – «Создание инновационной аппаратуры для экспресс-диагностики социально-значимых заболеваний в месте нахождения пациента». Программой предусмотрена разработка диагностических систем нового поколения для экспресс-диагностики наиболее распространенных заболеваний с применением инновационных методов исследования, в том числе базирующихся на технологии сухой химии (2019–2022 гг.). Решение поставленных в программе «ЛАБТЕХ» проблем позволит обеспечить раннюю диагностику заболеваний, повысить ее эффективность и сделать доступной ее осуществление вне стационарной лаборатории, что в конечном итоге приведет к повышению качества и увеличению продолжительности жизни населения страны.

Современные технологии внелабораторного анализа состоят в использовании специальных малогабаритных, портативных приборов – главным образом анализаторов сухой химии, не требующих специальной подготовки оператора к их применению для получения результата исследования. По этой причине они могут использоваться как врачами общей практики и других клинических специальностей, так и параклиническим персоналом – в амбулаторных, полевых условиях, спортивной медицине.

Технология сухой химии реализуется с применением специальных полосок, реагентные зоны которых содержат сухие реактивы (ферменты и/или неферменты), моноклональные антитела, способные воздействовать на определенные компоненты биологических жидкостей с изменением окраски индикаторной зоны.

Индикаторные тест-полоски могут предназначаться для качественного, полуколичественного и количественного определения диагностически значимых анализов мочи, крови, других биологических жидкостей. При этом не требуется специальной подготовки биологической пробы.

В основе подавляющего большинства используемых для экспресс-анализа вне лаборатории современных, высокотехнологичных тест-систем лежат иммунологические методы исследования, состоящие в применении двойных антител, нанесенных на специальные тест-полоски. В качестве таковых могут быть использованы разные по природе материала носители, среди которых иммуно-аналитическая тест-платформа, представляющая собой пористую матрицу, закрепленную на плотной подложке. В матрице закрепляют моноклональные антитела, имеющие метку для визуальной или оптической регистрации результата исследования (таковым обычно является коллоидное золото), который основывается на иммунных взаимодействиях в пористой матрице искомого аналита с моноклональными антителами. При этом пористая матрица действует как твердая фаза, с поверхностью которой связаны антитела. При наличии в биологической жидкости исследуемых веществ образуется комплекс антиген – антитело, который окрашивает зону в различные оттенки красного цвета.

С целью осуществления контроля качества пригодности тест-системы к выполнению аналитического исследования на матрице закрепляется некоторое количество чистого аналита. Появление в индикаторной зоне положительного пятна подтверждает, что все реагенты «работоспособны».

Изделия данного вида (для исследований вне лаборатории) применяются с целью определения компонентов биологической жидкости белковой или полипептидной структуры, например, кардиомаккеров, D-димера, C-реактивного белка в крови, хорионического гонадотропина в моче, а также ксенобиотиков: лекарств, наркотических средств и их метаболитов (опиаты, кокаин, марихуана, бензодиазепины, амфетамины, метадон и др.), многих иных веществ (рис. 1).

Количественная оценка совершающейся на тест-полоске (тест-платформе) реакции стала возможной благодаря применению анализаторов – отражательных фотометров либо флуориметров, представляющих собой специализированные портативные приборы,



Рис. 1. Отдельные виды наборов реагентов для определения наличия в биологической жидкости психоактивных веществ

обеспечивающие автономное выполнение полного цикла аналитического исследования вне условий стационарной клинико-диагностической лаборатории.

Эти устройства могут быть применены персоналом, не имеющим квалификации в области клинической лабораторной диагностики (например, врачом общей практики), а в ряде случаев – самими обследуемыми пациентами (или другими лицами).

Основные конструктивные и эксплуатационные характеристики изделий для исследований вне лаборатории

Чувствительность лабораторно-диагностических систем для выполнения исследований по месту лечения пациентов сопоставима с аналитической чувствительностью методов, применяемых в стационарных лабораториях. Их специфичность (избирательность) достаточно высокая для надежного распознавания искомого аналита без предварительной обработки пробы биологической жидкости (обычно проводимой для удаления возможных интерферентов); портативность, простота их использования значительно расширяют возможности применения такой своеобразной «лаборатории в миниатюре» в различных областях медицины.

Технологии сухой химии включают в себя ряд вариантов их использования:

- для однократного применения: в форме диагностической тест-полоски (иммуно-аналитической тест-платформы) с качественной или полуколичественной визуальной оценкой результата;
- для однократного использования: в форме диагностической тест-полоски (иммуно-аналитической тест-платформы) или картриджа с количественной оценкой результата с помощью ридера;
- для многократного применения: в форме картриджа с количественной оценкой результата с помощью настольного прибора;
- для использования во взаимодействии с дополнительным оборудованием (измерительные приборы, средства коммуникации и информатики).

Технологии выполнения исследований с применением наиболее широко доступных однократных диагностических тест-полосок, их характеристика

Тест-полоска однократного применения представляет собой изделие, содержащее импрегнированный в волокна альфа-целлюлозы или другого носителя высушенный комплекс химических реагентов в количествах, предусмотренных методом исследования (реакционная зона), отражательную часть и подложку. Тест-полоска может содержать одну или несколько реакционных зон, расположенных на единой подложке и предназначенных для обнаружения либо полуколичественного определения аналитов, составляющих диагностическую панель. Для защиты от возможных загрязнений и царапин реакционные зоны тест-полосок могут быть покрыты специальной полимерной сеткой, обеспечивающей быстрое и равномерное проникновение биологической жидкости и равномерное развитие окраски реакционной зоны (для предотвращения воздействия влаги на реагенты тест-полосок

контейнеры для хранения тест-полосок должны быть оснащены осушителем).

В основе методов, реализуемых с использованием тест-систем, лежат цветные реакции, приводящие к изменению окраски тестовой зоны полоски: это как обычные химические реакции, так и ферментативные. При использовании тест-системы результат получают в течение нескольких десятков секунд.

В зависимости от конструкции изделия оценка результата исследования может быть произведена и зарегистрирована разными способами:

- визуально путем субъективного сравнения оператором проявления реакции с прилагаемой к изделию цветной шкалой;
- с использованием методов абсорбционной фотометрии или флюориметрии;
- электрохимическим способом.

Принцип исследования, положенный в основу иммунохроматографического анализа (иммунохроматография)

Иммунохроматографический анализ (ИХА, сухой иммунохимии стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick) – быстрый метод выявления либо определения концентрации аналита в биологическом материале (моче, цельной крови, сыворотке или плазме, слюне, кале) при помощи индикаторных тест-полосок, тест-платформ или тест-кассет (рис. 2).

В данных тест-системах используют антитела трех типов: растворимые моноклональные, конъюгированные с коллоидным золотом; поликлональные антитела и вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко иммобилизованными в контрольной зоне тест-полоски.

Технологии исследования с использованием отражательного фотометра

Отражательные фотометры, или рефлектометры, – вид фотометрических устройств для количественного суммарного измерения потоков света, отраженного поверхностью реакционной зоны. Поскольку окраска различных реакционных зон неодинакова, может потребоваться измерение отраженного света на разных длинах волн.

Диагностическую полоску после удаления избытка мочи помещают в специальный держатель или укладывают на транспортер или на место считывания результата (в зависимости от конструктивных особенностей прибора). При работе на некоторых анализаторах нет необходимости предварительного удаления избытка мочи, поскольку он устраняется в процессе движения полоски на транспортере к фотометрическому модулю, в котором происходит детекция результата; конструкцией некоторых фотометров предусмотрена для этого специальная функция.

После помещения полоски в анализатор (отражательный фотометр) происходит измерение и распечатывание результата: количественного и полуколичественного.

Патологические результаты отмечаются особыми пометками (flag): звездочками, латинской буквой H (от английского слова high) и др.

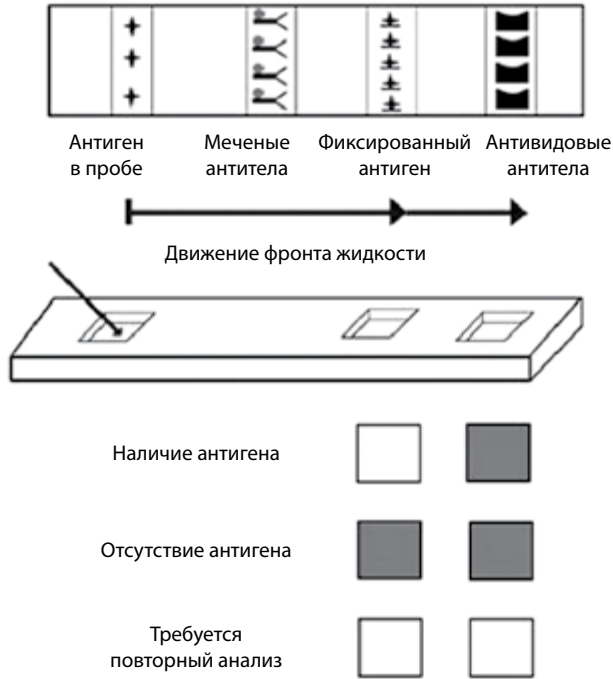


Рис. 2. Схема выполнения иммунохроматографического исследования методом сухой химии

В тест-полосках для исследования мочи с полуколичественным определением на отражательных фотометрах предусмотрены так называемые компенсационные зоны. Это зоны, как правило, белого цвета, не импрегнированы реактивами. Они представляют собой своего рода «холостые пробы», постановка которых необходима для приборной компенсации нативного окрашивания мочи в процессе обнаружения лейкоцитов, нитритов, белка, глюкозы, кетонов, уробилиногена, билирубина.

Технологии исследования крови и мочи с применением одно-разовых диагностических тест-полосок

При погружении тест-полоски в мочу до уровня ниже ограничительной линии анализируемая жидкость начинает подниматься по мембране под действием капиллярных сил и проходит нижний участок полоски с сорбированным на нем конъюгатом, который также начинает подниматься с током жидкости.

При отсутствии в пробе определяемого антигена окрашенные меченые антитела доходят до верхнего участка полоски с иммобилизованным антигеном (тест-зона), в результате чего происходит иммунная реакция, сопровождаемая окрашиванием зоны. В случае присутствия антигена в пробе (в концентрации не ниже установленного порогового уровня)

он взаимодействует с антителом с образованием иммунного комплекса, и такой иммунный комплекс не связывается с иммобилизованным антигеном в тест-зоне, а продолжает продвижение по тест-полоске. В итоге тест-зона остается неокрашенной. Далее иммунный комплекс антигена с антителом, меченым коллоидным золотом, продвигается до участка полоски с иммобилизованными антивидовыми антителами. На этом месте формируется антивидовой иммунный комплекс, что приводит к образованию окрашенной контрольной зоны. Окрашивание контрольной зоны должно иметь место всегда и служить контролем сохранности тест-полоски. Только в этих случаях тест-полоска может быть использована для выполнения исследований. Если окраски в контрольной зоне нет, то иммунореагенты тест-полоски не активны и результаты определения не представляется возможным оценить. В таких случаях необходимо повторить тестирование с помощью новой тест-полоски.

Структура и состав элементов диагностической полоски для исследования анализов в крови отличаются от таковых в диагностических полосках для мочи, поскольку состав и вязкость этих биологических жидкостей различаются. Необходимым элементом тест-полоски для исследования крови является верхний фильтрующий слой, служащий для отделения клеточных элементов крови от плазмы, которая и подвергается исследованию.

Сама полоска разделена на две зоны: сепарационную и реакционную. Проба крови наносится на сепарационную зону, покрытую фильтрующим слоем. После прохождения через разделительный слой плазма собирается в микрорезервуар. Поступающая в нижние слои носителя плазма либо просто перетекает в находящийся между правой и левой частями полоски отдел – резервуар для плазмы, либо до попадания в резервуар для плазмы приходит в соприкосновение с иммобилизованными внутри слоев зоны реагентами, способствующими удалению веществ, которые могут помешать определению искомого анализа.

Традиционно используемый алгоритм выполнения исследования на анализаторе сухой химии состоит в помещении тест-полоски в прибор, нанесении образца крови на тест-полоску и в измерении результата исследования, отображаемого на дисплее. При этом не требуется предварительной подготовки пробы к исследованию.

Полоска с нанесенной на нее биологической жидкостью (в качестве которой используется цельная кровь, сыворотка или плазма) не позднее чем через 15 с. после нанесения помещается в кюветную камеру отражательного фотометра. Результат исследования оценивается путем фотометрии при разных длинах волн: в зависимости от окраски соответствующей реакционной зоны.

Многослойные пленки в качестве подложки используют негнущийся пластик или другой подобный пластику материал, который может быть прозрачным или отражающим. Для усиления отражения света (что необходимо для процедуры измерения результата) поры пластика заполняют неорганическим пигментом (диоксид титана, сульфат бария, оксид цинка). В этом случае подложка приобретает функцию отражательного слоя.

Реактивная зона системы может состоять из нескольких слоев пленок, содержащих необходимые реагенты в сухой форме. Иногда

в систему включены дополнительные промежуточные слои, предназначенные для определения, разрушения или маскировки интерферирующих веществ, содержащихся в исследуемой пробе, а также слой, обеспечивающий равномерное проникновение биологической жидкости в реагентную зону.

В настоящее время наиболее часто используются методы сухой химии, основанные на формировании окрашенных комплексов в индикаторной зоне в ходе осуществления химической либо биохимической (ферментативной) реакции. Примером тому может служить тест определения глюкозы с использованием отражательного фотометра – глюкометра. Наряду с единичным аналитическим исследованием представляется возможным определение на тест-полоске ряда (до 11) отдельных диагностически значимых компонентов биологической жидкости (крови и мочи), различные совокупности которых составляют «панели» тестов определения конкретных заболеваний. Такие технологии сухой химии реализуются с применением тест-полосок первого поколения, примером которых могут быть визуальные диагностические полоски «ФАН» (Чехия), тест-полоски производства отечественных, белорусских (НТПК «Анализ Х», ООО «Мультилаб») предприятий (рис. 3).

Для полуколичественного и количественного определения выявляемых на тест-полоске компонентов, составляющих в совокупности спектр окрашенных зон, используются специальные отражательные фотометры. К числу таковых могут быть отнесены как приборы отечественного (ЗАО «СОЛАР») производства – экспресс-анализатор мочи АМ-2100, позволяющий качественно и полуколичественно определять до 11 параметров, в том числе эритроциты, лейкоциты, общий белок, глюкозу, уробилиноген, нитриты, кетоны, удельный вес и кислотность (рН) мочи, так и импортные (немецкие – фирмы «Берингер-Маннхейм», корейские и др.). Известные панели допускают возможность производить исследование с различным сочетанием индикаторных зон, позволяющих выявлять: глюкозу; глюкозу, кетоны; глюкозу, рН, кетоны; глюкозу, рН, кетоны, белок, кровь (эритроциты, гемоглобин); нитриты, удельную плотность, кетоны, уробилиноген, билирубин; лейкоциты, уробилиноген и др.).



Рис. 3. Исследование содержания отдельных компонентов мочи с применением тест-полосок первого поколения

Тест-полоски второго поколения заключают в себе потенциальные возможности к реализации качественно иных, значительно более высоких технологий, основывающихся на сочетании процедур осуществляемого на тест-полоске хроматографического разделения и последующего иммунологического определения (по реакции «антиген – антитело») на тест-полоске. В настоящее время они используются для диагностики инфекций, в том числе внутриутробных (вирусной, бактериальной, паразитарной этиологии), заболеваний, передаваемых половым путем, малярии, лямблиоза, кампилобактериоза, ВИЧ/СПИД, ротавирусов и аденовирусов и др., системных заболеваний соединительной ткани (системной красной волчанки, ревматизма и др.), инфаркта миокарда, сердечно-сосудистой недостаточности, тромбоза легочной артерии, сепсиса, анемии, заболеваний органов мочевыделительной системы, онкологических заболеваний (на основе определения иммуномаркеров: карциноэмбрионального антигена, альфа-фетопротеина, ПСА), отдельных форм эндокринных расстройств, аллергии, скрытой крови (трансферрин-кальпротектин-лактоферрин в кале), установления факта беременности, определения компонентов системы свертывания крови, чужеродных (в том числе наркотических, лекарственных) веществ.

Современное реагентное и приборное обеспечение позволяет осуществлять экспресс-определение методами иммунохроматографического и иммунофлуоресцентного анализа тех иммуномаркеров, спектр которых изначально закладывается в панелях используемых тест-систем для внелабораторного анализа.

Применение в практике Рост-анализа панелей, «запрограммированных» на вполне определенное сочетание лабораторных тестов, значительно расширяет возможности диагностики разных заболеваний, а также контроля над состоянием здоровья лиц вне стационарного лечебно-профилактического учреждения. Этому во многом способствует использование технологий сухой химии, реализуемых с применением современной автоматизированной аппаратуры.

Одним из таких приборов оказался анализатор биохимический Spotchem EZ, зарегистрированный в Республике Беларусь.

В отличие от портативных, регистрирующих ход совершения реакции на тест-полоске приборов он, по сути, представляет собой своеобразную мини-лабораторию для экспресс-диагностики, включает в себе дополнительные возможности к выполнению лабораторного исследования (в виде встроенной мини-центрифуги, системы калибровки магнитной карты, подключения считывателя штрих-кодов и пр.) и обладает памятью на 100 измерений. Анализатор позволяет выполнять более 60 исследований в час с одновременным измерением до 9 параметров.

Работа автоанализатора обеспечивается использованием нескольких видов тест-полосок, ряд которых включает панели лабораторных тестов (печеночную, почечную, сердечную, срочную и др.).

Нельзя не отметить, что аналитическая надежность таких лабораторно-диагностических систем в значительной мере определяется свойствами и стабильностью реагентов, включенных в структуру материала носителя тест-системы. Правильность результатов, получаемых

с помощью средств анализа вне лаборатории (по месту лечения), следует периодически проверять путем параллельного определения одних и тех же анализов биологических жидкостей обследуемых пациентов методами, используемыми в стационарной лаборатории (методом разделенных проб). Тем самым достигается гармонизация «прикроватной» лабораторной аналитики и деятельности стационарных лабораторий.

Таким образом, происшедшая за несколько последних десятилетий эволюция в области создания лабораторно-диагностических систем для экспресс-анализа на основе технологии сухой химии привела к тому, что на смену методам, реализуемым применением тест-полосок первого поколения с качественной либо полуколичественной визуальной оценкой результата, «пришли» тест-полоски второго поколения (использующие принцип иммунохроматографического анализа), позволяющие исследовать биомаркеры отдельных заболеваний с качественной, полуколичественной и количественной (приборной) оценкой результата. Усовершенствование же конструкции портативных регистрирующих приборов, в свою очередь, позволило не только повысить аналитическую чувствительность исследования (при переходе от абсорбционной фотометрии к флюориметрии), но и прийти к созданию автоанализаторов, по своим аналитическим характеристикам приближающихся к автоанализаторам жидкой химии.

Камышников В.С., Кузьменко А.Т., Батуревич Л.В.

Формула PUBLIC HEALTH приобрела еще большую актуальность и подтвердила статус единого собрания медицинского сообщества Украины

Итоги 28-й Международной медицинской выставки PUBLIC HEALTH 2019

В Международном выставочном центре, расположенном в сердце Киева, с 1 по 3 октября 2019 года уже в 28-й раз масштабно прошла Международная медицинская выставка PUBLIC HEALTH. Мы убедились в том, что выставка уверенно держит руку на пульсе отечественной системы здравоохранения, традиционно объединяет блок специализированных выставочных и конгрессных мероприятий и раскрывает весь комплекс актуальных тенденций развития мировой и отечественной медицины.

Выставка PUBLIC HEALTH получила громадный резонанс в профессиональной среде и представила значительный интерес для медицинских работников, бизнесменов, ученых, будущих врачей, представителей госучреждений и СМИ.

В новом формате выставка PUBLIC HEALTH стала знаковым и ожидаемым ежегодным событием для профессионалов здравоохранения и социальной сферы. Ее главными задачами являются эффективное продвижение инновационных технологий самого высокого уровня в ежедневную медицинскую и социальную практику, оснащение практикующих специалистов инструментарием для проведения качественной и своевременной диагностики и оказания медицинской помощи, а также всемерное повышение авторитета и престижности отечественной медицины.

Организаторы

Организаторами уникальной в Украине Международной медицинской выставки PUBLIC HEALTH выступают ДП «Премьер Экспо» (Украина) и ITE Group Plc (Великобритания). Безусловный успех данного проекта обусловлен жизненной важностью темы, но едва ли он смог бы развиваться так стремительно, если бы не международный опыт, умноженный на профессионализм его организаторов.

Директор выставки Инна Задорожня подчеркнула: «Международная команда PUBLIC HEALTH приложила массу сил и энергии для сплочения врачебного сообщества в Украине. Выставка этого года стала праздником науки и бизнеса в сфере здравоохранения, на котором профессиональной аудитории посетителей были представлены



прорывные медицинские, управленческие и информационные технологии. Вместе с экспонентами и партнерами мы сделали еще один шаг в будущее нашей медицины и заложили еще один кирпичик в основу всестороннего благополучия нашего общества. Проводимая реформа здравоохранения открывает новые возможности для всех участников процесса, и мы с удовольствием предоставляем эффективную площадку для ее реализации».

Признание

Официальную поддержку в проведении выставки оказали Национальная академия медицинских наук Украины, Национальный медицинский университет имени А. Богомольца, Украинская военно-медицинская академия, профессиональные ассоциации, общественные медицинские объединения и организации. В официальном открытии выставки PUBLIC HEALTH 2019 и мероприятиях ее деловой программы приняли участие: заместитель Министра здравоохранения Украины Михаил Загрийчук, пресс-секретарь Национальной академии медицинских наук Украины академик Владимир Михнев, проректор Национального медицинского университета имени А. Богомольца Александр Науменко, начальник Украинской военно-медицинской академии Валерий Савицкий, президент Global Healthcare Travel Council Виолетта Янышевская, а также другие авторитетные представители медицинского сообщества Украины.



Экспозиция

На единой площадке с PUBLIC HEALTH состоялись такие крупные мероприятия, как 7-я Международная выставка и конференция медицинского туризма MTEC.Kyiv, Международная выставка лабораторного оборудования и технологий LabExpo и Выставка стоматологического оборудования и материалов International Dental Forum. Целиком они составили масштабную экспозицию общей площадью 11 тысяч кв. м с участием 340 компаний из 13 стран мира. В 2019 году в выставках приняли участие 46 украинских фирм, что говорит об интересе отечественного бизнеса к теме здравоохранения. Свои передовые разработки во всех областях медицины представили ведущие украинские производители, такие как «Голнит», «Виола Медтехника», «Контакт Фирма», «Квант», «Медаппаратура», «Завет», «Сканнер», «Телеоптик» и многие другие, а также всемирно известные компании Canon Medical System, Shimadzu, Esaote, Heaco, Philips Healthcare, GE Healthcare, FujiFilm, Omron, Mindray, ACCURAY и другие. Среди более 12 тысяч профессиональных посетителей выставки, 86% которых относятся к категории Decision Makers, были специалисты практически всех направлений медицины из всех регионов Украины и из-за рубежа.



Посетители PUBLIC HEALTH 2019 ознакомились с тематическими разделами выставок, среди которых: медицинская техника и оборудование, инструменты, изделия медицинского назначения, ортопедическая и реабилитационная техника, офтальмология, экстренная медицина, репродуктивная и перинатальная медицина, фармакология, цифровая медицина, медицинский туризм, стоматологическое оборудование и материалы, лабораторная медицина, здоровый образ жизни.

Достижения

Обширная программа научно-практических и деловых мероприятий Public Health Congress & Events раскрыла актуальные проблемы отечественной медицины и наглядно продемонстрировала достижения и



возможности развития системы здравоохранения, затронувшие медицинские учреждения всех форм собственности. Было проведено 39 специализированных конференций, семинаров, секций, круглых столов, а также мастер-классов и тренингов по основным разделам медицины.

Некоторые мероприятия необходимо отметить отдельно. В частности, 7-й Международный конгресс МТЕС.Київ продемонстрировал тенденции развития медицинского туризма в Украине и мире. Новинки отрасли освещались в 3D-измерении –

как с позиции медицинского учреждения, так и туристического оператора и клиента. Международная программа B2B конгресса представила возможности отечественных лечебных учреждений для развития актуального направления – въездного медицинского туризма.

Обширный раздел мероприятий был посвящен сложным вопросам трансформации, управления и улучшения законодательной базы системы здравоохранения. Он нашел отражение в симпозиуме «Охрана здоровья и национальная безопасность Украины», конференции «Эффективное управление системой охраны здоровья» и конференции «Медицинская помощь территориальной громады – современные возможности».

Национальный медицинский университет имени А. Богомольца предоставил возможность за 3 дня ознакомиться с последними достижениями медицинской науки и практики в рамках конференции, которая включала 11 специализированных секций. В конференции приняли участие более 1000 врачей различных специальностей.

Огромный интерес вызвали специализированные мероприятия, среди которых «Ophthalmic Light. Противоречия в офтальмологии», «Школа реабилитации», «Public Health: школа УЗД», мастер-классы Института эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л. Громашевского, Института педиатрии, акушерства и гинекологии имени академика О. Лукьяновой НАМН Украины, «Современное акушерство – долгий путь к совершенству», «Новый взгляд на медсестринство», «Мифы инфекционного контроля в ЛПУ», при содействии Европейской бизнес-ассоциации.

Образовательная составляющая Public Health Congress & Events традиционно соответствовала современным критериям непрерывного профессионального роста медицинских специалистов и менеджеров.

В традиционном разделе Digital Med на открытой площадке и на стендах участников нашли отражение тенденции развития современных цифровых технологий в медицине. Среди основных тем Digital Med 2019 были такие как: eHealth, доказательная медицина в смартфоне, искусственный интеллект, телемедицина, информатизация вторичного звена, безопасность, приложения для пациентов, программное обеспечение для здравоохранения.

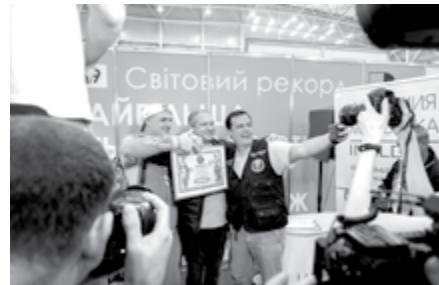
В финале популярного Всеукраинского конкурса «Главный врач года» соревновались лучшие главврачи медучреждений из всех регионов Украины. Стал победителем и удостоился награды «Главный врач 2019» Константин Рожин, Главный врач КНП БРР «Белопольский ЦПМД» Сумской области. Более 140 участников праздника «День главного врача» получили новые знания и практические навыки по эффективному управлению современным медицинским учреждением.



Новые возможности и форматы интенсивного профессионального развития медицинских специалистов и управленцев были реализованы в турборежиме Public Health Congress & Events. Генеральным информационным партнером этой программы выступила образовательная онлайн-платформа Accemedin.

Впервые в Украине был представлен уникальный тренинг-проект «Медицинская помощь по стандартам НАТО и ЕС». На протяжении двух дней преподаватели Украинской военно-медицинской академии, многие из которых – участники АТО, обучали практическим навыкам оказания первой медицинской помощи в соответствии с международными стандартами.

Очень важно то, что в этом году именно выставка PUBLIC HEALTH стала платформой для проведения интерактивных мероприятий с экспертами, лидерами общественного мнения, медиками, учеными, предпринимателями и популярными в профессиональной среде блогерами, установления медицинских (и не только) рекордов. В частности, во время проведения выставки PUBLIC HEALTH 2019 был официально зафиксирован новый мировой рекорд – в одновременном сеансе массажа приняли участие 752 мастера-массажиста.



Уникальный сервис выставки – Prof Meeting – позволил посетителям вживую познакомиться с медицинскими инновациями мирового уровня и найти нужных для бизнеса партнеров, благодаря высокому потенциалу профессиональных экспонентов и представленных ими брендов.

Амбиции

PUBLIC HEALTH 2019, несомненно, стала бизнес-событием года для отечественного рынка медицинских товаров и услуг. Экспоненты выставки в полной мере воспользовались предоставленными возможностями, выгодно презентовали свою продукцию целевой аудитории,



сформировали новые деловые связи и привлекли необходимые инвестиции.

Руководители медицинских учреждений получили доступ к широкому спектру предложений по техническому переоснащению больниц и клиник для оказания более сложных и качественных медицинских услуг.

Постоянные участники и партнеры выставки отметили существенный качественный рост мероприятий. 67% опрошенных экспонентов подтвердили участие в выставке в 2020 году.

Очевидно, что безупречная репутация организаторов и высокое международное признание выставки сделали возможным ежегодное расширение географии ее экспонентов. Это дает украинским медикам и бизнесменам возможность налаживать партнерство с ведущими медицинскими центрами и производителями продукции медицинского назначения.

29-я Международная медицинская выставка PUBLIC HEALTH, Международная выставка и конференция медицинского туризма MTEC.Kyiv, Международная выставка лабораторного оборудования и инновационных технологий LabExpo, Выставка стоматологического оборудования и материалов IDF, а также комплекс обучающих и экспертных мероприятий Public Health Congress & Events будут проходить с 7 по 9 октября 2020 года в Международном выставочном центре в Киеве.

КОНТАКТЫ ОРГАНИЗАТОРОВ PUBLIC HEALTH:

ДП «Премьер Экспо» (ITE Group Plc).
Директор выставки – Инна Задорожня.
Работа со СМИ – Богдана Маевская.

Тел.: +380 (44) 496 8645 (доп. 234,274);
Mail to: I.Zadorozhnya@pe.com.ua;
Mail to: B.Maevskaya@pe.com.ua;
Internet: www.publichealth.com.ua.

Spotchem EZ – миналаборатория для экспресс-диагностики



Читайте статью:
"Внелабораторный анализ:
современные технологии
сухой химии в практике
лабораторного исследования
вне стационарной клинико-
диагностической лаборатории"
на стр. 587–595.



Spotchem EZ автоматический биохимический **переносной**
экспресс-анализатор, работающий по технологии «сухая химия»



Вест·Эко·Мед·С

СОВРЕМЕННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ СИСТЕМЫ

ООО "Вест-Эко-Мед" РБ, 220020, г. Минск, пр-т Победителей, д.103, офис. 1014.
Тел./факс: 8 (017) 308 79 35, 308 79 74, E-mail: info@ecomeds.by

На правах рекламы. Медицинская техника.
Для профессионального использования.