

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

2022, том 11, № 3

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics. Eastern Europe

International Scientific Journal

2022 Volume 11 Number 3



Сердолик (карнеол) – разновидность кварца преимущественно оранжево-красной расцветки. Этот распространенный в ювелирном искусстве минерал известен с давних времен: древние египтяне носили на своей одежде застёжки из сердолика в форме трехлистного клевера, что символизировало покровительство богини Исида.

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

 ПИ
ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

lab.recipe.by

2022, том 11, № 3

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
Министерством юстиции Украины 23.04.2021
Регистрационное свидетельство КВ № 24792-14732ПР

Учредители:
Национальный университет здравоохранения Украины
имени П.Л. Шупика
УП «Профессиональные издания»

Адрес редакции:
ООО «Профессиональные издания. Украина»
04116, г. Киев, ул. Старокиевская, 10-Г,
сектор «В», офис 201

Контакты:
Тел.: +38 (096) 851-40-34
e-mail: admindom@ukr.net

Отдел рекламы:
Тел.: +38 (067) 102-73-64
e-mail: pi_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 офис в Киеве

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.
Цена свободная

Подписано в печать 05.09.2022.
Тираж в Беларуси 1000 экз.
Тираж в Украине 101 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.

Главный редактор

Камышников Владимир Семенович,

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования (Беларусь)

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц. (Минск, Беларусь)

Аниско Л.А., к.м.н. (Минск, Беларусь)

Бадыгина Н.А., к.б.н. (Минск, Беларусь)

Батуревич Л.В., к.м.н., доц. (Минск, Беларусь)

Беляев С.А. (Минск, Беларусь)

Вергун О.М., к.б.н., доц. (Минск, Беларусь)

Владимирская Т.Э., к.б.н. (Минск, Беларусь)

Гусина Н.Б., к.м.н., доц. (Минск, Беларусь)

Державец Л.А., д.б.н. (Минск, Беларусь)

Долгов В.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Доценко Э.А., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Дубровский А.Ч., к.м.н. (Минск, Беларусь)

Коломиец Н.Д., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф. (Витебск, Беларусь)

Костюк С.А., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Кочетов А.Г., д.м.н. (Москва, Россия)

Кузьменко А.Т., к.м.н., доц. (Минск, Беларусь)

Лелевич В.В., д.м.н., проф. (Гродно, Беларусь)

Ляликов С.А., д.м.н., проф. (Гродно, Беларусь)

Новикова И.А., д.м.н., проф. (Гомель, Беларусь)

Потапнев М.П., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Прохорова В.И., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Смолякова Р.М., д.б.н., проф. (Минск, Беларусь)

Таганович А.Д., д.м.н., проф. (Минск, Беларусь)

Рецензируемое издание

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

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

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

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

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

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by

2022 Volume 11 Number 3

Founded in 2011

Belarus

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

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

Address of the editorial office:
220049, Minsk, Knorin st., 17
Phones: +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 Ministry of Justice of Ukraine 23.04.2021
Registration certificate KB No. 24792-14732/П

Founders:
Shupyk National Healthcare University of Ukraine
UE "Professional Editions"

Address of the editorial office:
LLC "Professional Editions. Ukraine"
04116, Kyiv, Starokievskaya st., 10-G,
sector "B", office 201

Contacts:
Phone: +38 (096) 851-40-34
e-mail: admin@ukr.net

Advertising department:
Phone: +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 the office in Kyiv

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

Sent for the press 05.09.2022.
Circulation in Belarus is 1000 copies
Circulation in Ukraine is 101 copies
Order No.

Format 70x100 1/16 Litho

Printed in printing house

Editor-in-Chief**Vladimir S. Kamyshnikov,**

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of the Clinical Laboratory Diagnostics
Department of the Belarusian Medical Academy
of Postgraduate Education (Belarus)

Editorial Board:

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk, Belarus)
Anisko L., Cand. of Med. Sci. (Minsk, Belarus)
Badygina N., Cand. of Biol. Sci. (Minsk, Belarus)
Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk, Belarus)
Beliaev S. (Minsk, Belarus)
Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci. (Minsk, Belarus)
Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Moscow, Russia)
Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci. (Minsk, Belarus)
Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk, Belarus)
Kochetov A., Dr. of Med. Sci. (Moscow, Russia)
Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Vitebsk, Belarus)
Kostyuk S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk, Belarus)
Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno, Belarus)
Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno, Belarus)
Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Gomel, Belarus)
Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk, Belarus)
Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Minsk, Belarus)
Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci. (Minsk, Belarus)

Peer-Reviewed Edition

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

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

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

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

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

Уважаемые читатели!

Настоящий номер журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» открывается статьей, в полной мере отвечающей формулировке области исследований специальности 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика»: «Основы организационного обеспечения клинической лабораторной диагностики. Организационно-управленческие и информационные технологии, алгоритмы лабораторного исследования; оптимизация системы лабораторного менеджмента и осуществления контроля качества на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах. Разработка на основании клинко-лабораторных исследований теоретической базы для поисковых диагностических программ. Критерии оценки деятельности клинко-диагностических лабораторий». Ознакомление с ней позволит не только воспринять опыт применения в лабораторной медицине инновационных, передовых технологий, но также способствовать дальнейшему развитию службы и специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Затронуты вопросы подготовки не только научных, но и профессиональных кадров в области лабораторной медицины. Так, представлен отклик на актуальную тему, затронутую на состоявшемся 18 июля 2022 г. совещании Президента Республики Беларусь с представителями руководства Министерства здравоохранения Республики Беларусь и медицинских университетов страны, – о стратегических направлениях дальнейшего совершенствования системы последипломной подготовки врачей.

По сложившейся традиции уделено внимание лабораторным исследованиям в спорте высших достижений. В одной из статей приведено научное обоснование использования алгоритма применяемых в спортивной медицине лабораторных тестов для выявления «относительного дефицита энергии» у спортсменок раннего пубертатного возраста, что может привести к патологическим компонентам «триады женщин-атлеток». С содержанием этой статьи перекликается и другая, раскрывающая перспективы изучения роли сиаловых кислот и формируемого при их участии «дзета»-потенциала эритроцитов в осуществлении транспорта кислорода из русла крови в жизненно важные органы.

В номере опубликованы результаты как оригинальных исследований, связанных с разработкой новых технологий лабораторного анализа, так и исследований, базирующихся на применении общеизвестных тестов, непосредственно востребованных в клинической практике.



Нашими коллегами из Российской Федерации представлен материал, позволяющий уточнить трактовку изменения уровней кардиомаркеров у пациентов с проявлениями острого коронарного синдрома.

В соответствии с предусмотренной редакционной коллегией тематикой опубликования работ в данном номере также представлены материалы, отражающие содержание высокотехнологичных исследований и перспективы их дальнейшего развития в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск, Беларусь).

Надеемся, что вся опубликованная информация окажется востребованной специалистами клинической лабораторной диагностики.

Главный редактор
Камышников Владимир Семенович



Передовые технологии в медицине

Выдрицкий А.В., Бородовская В.Н., Таврель А.А., Белоусова Г.В., Пархамович В.Н., Муравская Я.П., Гулякевич А.Г.
Инновационные технологии как фактор повышения качества лабораторных исследований253

Лабораторные исследования в спорте высших достижений

Чиркин А.А., Алтани М.С., Степанова Н.А., Чиркина А.А.
Изменения биохимических показателей сыворотки крови у подростков женского пола при занятиях спортом268

Оригинальные исследования

Полякова Е.А., Стёганцева М.В., Луцкович Д.В., Белевцев М.В.
Оценка состояния звеньев Т- и В-клеточного иммунитета на основе использования технологии определения эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TREC/KREC)279

Луцкович Д.В., Столярова Е.А., Полякова Е.А., Мелешко А.Н.
Значимость идентификации реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе289

Астрамович В.А., Баровская Ю.А., Капуза Д.Р., Наумович М.Г., Стёганцева М.В.
Метод выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 у пациентов детского возраста с острым миелоидным лейкозом300

Лабораторные исследования в клинической медицине

Юревич В.В., Шестакова Е.В., Муравейник Н.П.
Клиническая и патогенетическая информативность сочетанного исследования лабораторных показателей воспаления и состояния липидного обмена у пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом 309

Гурбо Т.О., Кондаурова С.Л.
Микробиологический скрининг штаммов Enterobacterales, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями317

Обзоры и лекции

Чаулин А.М.
Гендерные особенности уровней содержания сердечных тропонинов в сыворотке крови и значимость использования сведений о них в тактике диагностики острого коронарного синдрома (обзор литературы)323

Пыко К.В., Беспалов Ю.А., Осочук С.С.
Роль сиаловых кислот и ζ-потенциала эритроцитов в осуществлении транспорта кислорода из русла крови в жизненно важные органы и ткани: обзор современных данных339

Скоповец Е.Я., Белевцев М.В.
Изменения микробиома кишечника при первичных иммунодефицитах: обзор современных данных349

Казак В.И., Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я.
Инвазивные грибковые инфекции: эпидемиология и диагностика (обзор литературы)363

Подготовка кадров

Камышников В.С.
Институт резидентуры по лабораторной медицине: опыт его формирования, организация клинико-лабораторной деятельности и система подготовки врачей-специалистов (медицинских патологов) за рубежом375

Advanced Technologies in Medicine

Vydrytski A., Baradouskaya V., Tavrel A., Belousova G., Parkhamovich V., Murauskaya Y., Gulyakevich A.

Innovative Technologies as a Factor in Improving the Quality of Laboratory Research 254

Laboratory Research in Elite Sports

Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A.

Changes in Biochemical Indicators of Blood Serum in Female Adolescents During Sports 269

Original Researches

Polyakova E., Stegantseva M., Lutskovich D., Belevtsev M.

Evaluation of T- and B-cell Immunity Based on the T- and B-cell Receptor DNA Excision Circles (TREC/KREC) Detection Technology 280

Lutskovich D., Stolyarova E., Polyakova E., Meleshko A.

Significance of Identification of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements for the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in B-Linear Acute Lymphoblastic Leukemia 290

Astramovich V., Barouskaya Y., Kapuza D., Navumovich M., Stegantseva M.

Method of the NUP98-NSD1 Detection in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia 301

Laboratory Research in Clinical Medicine

Yurevich V., Shestakova E., Muraveinik N.

Clinical and Pathogenetic Information Value of a Combined Study of Laboratory Indicators of Inflammatory and the State of Lipid Metabolism in Patients with Chronic Suppurative Otitis Media Involving Epitympanum 310

Hurbo T., Kondaurava S.

Microbiological Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Strains in Children with Oncohematological Diseases 318

Reviews and Lectures

Chaulin A.

Gender Characteristics of the Levels of Cardiac Troponins in Blood Serum and the Importance of Using Information About them in the Tactics of Diagnosis of Acute Coronary Syndrome (Literature Review) 324

Pyko K., Bespalov Yu., Osochuk S.

The Role of Sialic Acid and Red Blood Cells Zeta Potential in Oxygen Transport from Bloodstream to Vital Organs and Tissues: Review of Current Data 340

Skapavets K., Belevtsev M.

Changes in the Intestinal Microbiome in Primary Immunodeficiency: Review of Current Data 350

Kazak V., Tchernovetskiy M., Skapavets K.

Invasive Fungal Infections: Epidemiology and Diagnosis (Literature Review) 364

Personnel Training

Kamyshnikov V.

Institute of Residency in Laboratory Medicine: The Experience of Its Formation, the Organization of Clinical and Laboratory Activities and the System of Training Medical Specialists (Medical Pathologists) Abroad 376



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.001>



Выдрицкий А.В.✉, Бородовская В.Н., Таврель А.А., Белоусова Г.В., Пархамович В.Н.,
Муравская Я.П., Гулякевич А.Г.
Независимая лаборатория ИНВИТРО, Минск, Беларусь

Инновационные технологии как фактор повышения качества лабораторных исследований

Конфликт интересов. Статья подготовлена по заказу ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО».

Вклад авторов: Выдрицкий А.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста, сбор и анализ материала; Бородовская В.Н., Таврель А.А., Белоусова Г.В., Пархамович В.Н., Муравская Я.П., Гулякевич А.Г. – написание текста, редактирование.

Подана: 21.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: avydriczkij@invitro.ru

Резюме

Введение. Современные инновационные технологии позволяют значительно повысить уровень качества оказания медицинской помощи населению, в том числе и в области лабораторных исследований.

Цель. Изучение инновационных технологий, реализованных на всех этапах лабораторного анализа на примере ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО».

Материалы и методы. Анализ влияния внедренных инновационных технологий на различные показатели (экономические, технические, временные) в деятельности ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО».

Результаты. В результате проведенного исследования сделана оценка влияния инновационных технологий на качество предоставляемых лабораторных исследований.

Выводы. Внедрение инновационных технологий, как разработанных в группе компаний ИНВИТРО, так и предлагаемых мировыми производителями, позволяет значительно повысить качество оказания лечебно-диагностической помощи населению.

Ключевые слова: инновационные технологии, лабораторная диагностика, технологический процесс, эффективность, автоматизация, международный стандарт, концепция «Шесть сигм»

Vydrytski A.✉, Baradouskaya V., Tavrel A., Belousova G., Parkhamovich V., Murauskaya Y., Gulyakevich A.

Independent Laboratory INVITRO, Minsk, Belarus

Innovative Technologies as a Factor in Improving the Quality of Laboratory Research

Conflict of interest. The article was prepared by order of Independent laboratory INVITRO.

Authors' contribution: Vydrytski A. – the concept and design of the study, writing the text, collecting and analyzing the material; Baradouskaya V., Tavrel A., Belousova G., Parkhamovich V., Murauskaya Y., Gulyakevich A. – writing the text, editing.

Submitted: 21.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: avydriczki@invitro.ru

Abstract

Introduction. Modern innovative technologies can significantly increase the level of quality of medical care to the population, including in the field of laboratory research.

Purpose. The study of innovative technologies implemented at all stages of laboratory analysis on the example of Independent Laboratory INVITRO.

Materials and methods. Analysis of the impact of introduced innovative technologies on various indicators (economic, technical, temporary) in the activities of Independent Laboratory INVITRO.

Results. As a result of the study, an assessment was made of the impact of innovative technologies on the quality of laboratory tests provided.

Conclusions. The introduction of innovative technologies, both developed by the INVITRO group of companies and offered by global manufacturers, can significantly improve the quality of medical and diagnostic care for the population.

Keywords: innovative technologies, laboratory diagnostics, technological process, efficiency, automation, international standard, Six Sigma concept

■ ВВЕДЕНИЕ

Для любого человека здоровье является базовым и неотъемлемым условием его жизни. Современные технологии проникают во все сферы деятельности и меняют их. Развитие касается многих наукоемких отраслей экономики, в том числе и медицины как важнейшей и во многом показательной отрасли любой развитой страны. Благодаря внедрению инновационных технологий диагностики и лечения заболеваний, появлению высокотехнологичного оборудования улучшилось качество медицинского обслуживания и жизни граждан. Внедрение инноваций в практическое здравоохранение вносит существенный вклад в улучшение качества и увеличение продолжительности жизни населения. Именно благодаря инновациям медицинская отрасль в настоящее время является одним из наиболее бурно развивающихся направлений.

Законом Республики Беларусь от 19 января 1993 г. № 2105-XII «Об основах государственной научно-технической политики» были определены следующие понятия:

- инновационная деятельность – деятельность, обеспечивающая создание и реализацию инноваций;



- инновации (нововведения) – создаваемые (осваиваемые) новые или усовершенствованные технологии, виды продукции или услуг, а также организационно-технические решения производственного, административного, коммерческого или иного характера, способствующие продвижению технологий, продукции и услуг на рынок;
- научно-техническая деятельность – деятельность, включающая проведение прикладных исследований и разработок с целью создания новых или усовершенствования существующих способов и средств осуществления конкретных процессов. К научно-технической деятельности относятся также работы по научно-методическому, патентно-лицензионному, программному, организационно-методическому и техническому обеспечению непосредственного проведения научных исследований и разработок, а также их распространения и применения результатов [1].

Медицинские технологии, наряду с энергосбережением и информационными технологиями, являются приоритетными направлениями развития большинства стран мира.

Сегодня инновации в здравоохранении востребованы как никогда ранее. Особую актуальность инновационные подходы в здравоохранении приобретают в условиях глобального экономического кризиса.

Одной из главных задач внедрения современных технологий является обобщение и распространение опыта и уникальных достижений с одновременным снижением финансовых и ресурсных затрат.

С учетом сегодняшнего состояния экономики внедрение инновационных технологий на современном этапе рыночных реформ должно способствовать развитию научно-технического потенциала, формированию современных технологических укладов в различных отраслях экономики. Инновационная деятельность направлена на создание и практическое использование (доведение до потребителя) новых или усовершенствованных видов продукции, технологий, услуг или организационных решений административного, производственного, коммерческого или иного характера, обеспечивающих экономический (социальный, экологический или иной) эффект.

Целью данной статьи является оценка инновационных технологий как фактора повышения эффективности медицинской помощи. На примере деятельности ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО» и на основе реализованных инновационных решений оценить достигнутые преимущества, их влияние на эффективность в оказании предоставляемой медицинской помощи населению, а именно – предоставления лабораторных услуг.

■ ИООО «НЕЗАВИСИМАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ИНВИТРО»

Общая информация

Иностранное общество с ограниченной ответственностью «Независимая лаборатория ИНВИТРО» в Республике Беларусь (далее – Компания) входит в холдинг – группу компаний, работающих под брендом ИНВИТРО.

ИНВИТРО – международный частный медицинский холдинг, специализирующийся на лабораторной диагностике и оказании других медицинских услуг.

Технологический процесс и общий принцип организации работы, этапы лабораторного анализа

Технологический процесс в ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО» основан на принципах стандартизации всех этапов лабораторного исследования, анализе результатов внутрилабораторного контроля качества и внешней оценки качества.

Для взятия, транспортировки, хранения и обработки биологического материала (биоматериала) – сыворотки, плазмы или цельной крови – для исследования в клинико-диагностической лаборатории используются вакуумные пробирки. Это пластиковые пробирки с заданным уровнем вакуума для взятия точного количества венозной крови. Пробирки вакуумные закрыты безопасными крышками со специальной цветовой кодировкой в зависимости от вида исследования. Пробирки, концентрации наполнителей, объемы жидких наполнителей и их допустимые количества, так же как и соотношение «кровь – реагент», соответствуют требованиям и рекомендациям международных стандартов ISO 6710 (EN 14820) «Одноразовые контейнеры для взятия проб венозной крови» и Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Система вакуумных пробирок позволяет избежать многих ошибок за счет исключения ручных операций дозирования крови и реагентов, минимальной травматизации форменных элементов крови и удобной системы идентификации проб. Выбор типа пробирки зависит от метода исследования, тест-систем и/или оборудования, на котором эти тесты выполняются.

После взятия биоматериала пробирке присваивается уникальный штрихкод, в котором закодированы личные данные пациента и перечень заказанных лабораторных тестов для исследования. Штрихкодирование пробирок обеспечивает уникальную идентификацию биологического материала, использование первичных пробирок в технологическом процессе исключает вероятность случайной подмены пробирок и ошибок в технологическом процессе при переносе биологического материала во вторичные пробирки.

Технологический процесс применения вакуумных пробирок для исследований прошел процедуру валидации (валидация сохранности аналитов при различных температурных режимах, временных отрезках, калибровка дозирующих устройств анализаторов в зависимости от характеристик пробирок: высота, диаметр, объем биоматериала).

Биологический материал с соблюдением температурного режима доставляется в термоконтейнерах соответствующего типа на исследование. Собственная логистическая служба позволяет решить один из ключевых вопросов в соблюдении «холодовой цепи» – время, затраченное на транспортировку. Использование устройств, регистрирующих температуру (терморегистраторы, логгеры), которыми оснащен каждый контейнер с биоматериалом, дает возможность контролировать ее на всех этапах транспортировки. Это объективный и перспективный метод контроля за соблюдением температурного режима. Терморегистраторы позволяют установить момент, степень и продолжительность нарушения температуры внутри транспортного контейнера и, как следствие, принять решение о возможности выполнения исследований, а также установить причину и провести корректирующие мероприятия.

Лабораторные исследования в клинико-диагностической лаборатории ИНВИТРО выполняются с использованием современного высокотехнологичного оборудования, максимально исключая влияние человеческого фактора на



технологический процесс, что позволяет обеспечить высокую воспроизводимость и достоверность результатов.

Все анализаторы, используемые в лаборатории, объединены лабораторной информационной системой (ЛИС). Эта система обеспечивает передачу и архивирование информации с момента взятия и регистрации биоматериала до получения пациентом результатов исследований.

При невозможности применения валидированных вакуумных пробирок допускается прием биоматериала в стандартных вторичных пробирках (пластиковых пробирках с крышками без наполнителей) с характеристиками (высота, диаметр, объем биоматериала), идентичными первичным пробиркам.

Общая схема рабочего процесса следующая:

- в отделениях медицинского обслуживания (ОМО) проводится прием пациентов, оформление счета-заказа, взятие (забор) и/или прием биологического материала (кровь, моча, кал, волосы и др.) от пациентов, штрихкодирование пробирок с биоматериалом;
- транспортировка собственной логистической службой с соблюдением температурного режима биологического материала в Технологический департамент;
- прием, сортировка, регистрация биоматериала в отделе регистрации и передача в клинико-диагностическую лабораторию (КДЛ);
- проведение исследования в КДЛ, валидация результатов исследований;
- направление результатов исследований пациентам.

Биологический материал для исследований поступает и от коммерческих партнеров Компании, это медицинские учреждения государственной и частной форм собственности.

Выделяют 3 основных этапа лабораторного анализа:

- преаналитический этап;
- аналитический этап;
- постаналитический этап.

Преаналитический этап – это время с момента направления пациента на лабораторное исследование до момента поступления биологического материала в лабораторию. Соблюдение необходимых условий на данном этапе обеспечивается совместными усилиями медицинского персонала (лечащих врачей, медицинских сестер) и сотрудников лаборатории. Составляется запрос на анализ, соблюдается соответствующая подготовка пациента к исследованиям, правильное взятие биологического материала, пробоподготовка биоматериала, а также его своевременная и правильная транспортировка. Со стороны лаборатории врачам-клиницистам должна быть предоставлена полная информация о правильном выполнении данного этапа: особенностях подготовки пациента, способах взятия и хранения биологического материала для исследований и его транспортировки. Все указанные процедуры осуществляются до поступления материала в лабораторию, поэтому эту часть преаналитического этапа часто называют предлабораторной.

С момента поступления материала в лабораторию начинается лабораторная часть преаналитического этапа, которая включает:

- прием и регистрацию проб для исследования;
- подготовку проб биоматериала для исследований (пробоподготовка);
- подготовку расходных материалов и оборудования.

Аналитический этап – время непосредственного выполнения аналитической процедуры по определению того или иного, указанного в направлении, исследования.

Постаналитический этап, как и преаналитический, делится на внутрिलाбораторную и внелабораторную части. Внутрिलाбораторная часть подразумевает оценку врачом лабораторной диагностики достоверности полученного результата или выдачу клинико-лабораторного заключения. Достоверность результата рассматривается с точки зрения соответствия предполагаемому диагнозу, динамики показателя и взаимосвязи с другими лабораторными параметрами. Кроме того, полученный результат сравнивается с референтным интервалом. При этом в ряде случаев необходимо установление в лаборатории собственных референтных интервалов для проведения адекватной оценки. Интерпретация результатов врачом-клиницистом с последующей постановкой или корректировкой диагноза с принятием решений по тактике лечебно-диагностического процесса является внелабораторной частью постаналитического этапа [3].

Важно отметить, что на каждом этапе производства лабораторных анализов могут возникать ошибки и оказывать влияние на конечный результат, а как следствие – на эффективность оказания медицинской помощи. По данным разных источников литературы, источники ошибки распределяются следующим образом:

- преаналитический этап – 65–70%;
- аналитический этап – 10–15%;
- постаналитический этап – 20–25%.

Таким образом, преаналитический этап в общей схеме рабочего процесса Компании соответствует периоду с момента обращения пациента до поступления биологического материала непосредственно на анализ (помещения образца биоматериала в анализатор). Аналитический этап соответствует проведению исследования в КДЛ. Постаналитический этап соответствует процессу валидации полученных результатов исследований до отправки их пациенту.

Описание технологического процесса, общей схемы выполнения исследований рабочего процесса, этапов производства лабораторных анализов и процента возникновения ошибок необходимо для понимания, на каком из этапов внедрены инновационные разработки и какими преимуществами они обладают, тем самым способствуя повышению эффективности медицинской помощи (в понимании деятельности Компании – лабораторного исследования).

Инновационные технологии в деятельности ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

В лабораторию для исследований поступает различный биологический материал, наибольшая часть поступающего материала – это пробирки с кровью.

Лаборатория в общем понимании это централизованная технологическая площадка, оснащенная современным высокотехнологичным оборудованием и применяющая в своей работе значительное количество современного специализированного программного обеспечения.

В практику работы Компании внедрена и полноценно работает процедура штрихкодирования. Штрихкод – зашифрованная информация, визуально отображенная в виде чередующихся черных и белых полос, которую можно считать специальными сканерами.



На этом этапе сотрудник ОМО формирует заказ и присваивает ему уникальный штрихкод. Все данные о клиенте в его присутствии вносятся в информационную систему. Полоски носителя со штрихкодом приклеиваются к пробирке в присутствии пациента непосредственно в процедурном кабинете после взятия образца крови. В дальнейшем пробирка транспортируется с соблюдением необходимого температурного режима в централизованную лабораторию и попадает на все необходимые анализаторы. Современное оборудование позволяет в 99% случаев использовать «первичную пробирку», т. е. биоматериал, например кровь, не переливается из одной большой пробирки, как практиковалось раньше, по нескольким пробиркам меньшей вместимости, что может оказать негативное влияние на качество выполнения исследования. Использование штрихкодов на этапе формирования заказа позволяет полностью исключить влияние человеческого фактора на всех этапах транспортировки биоматериала: от места его взятия до постановки пробы в анализатор.

Задачи, решаемые применением штрихкодирования:

- сокращение ошибок идентификации пациента;
- защита конфиденциальности пациента;
- сокращение ошибок идентификации образца;
- автоматизация процесса маркировки проб;
- легкая архивация и поиск образцов.

Преимущества:

- внедрение штрихкодирования образцов на преаналитическом этапе позволяет улучшить его качество;
- штрихкодирование обеспечивает уникальную идентификацию биоматериала и совершенно исключает вероятность случайной подмены или перепутывания пробирок.

К числу внедренных в практику лабораторного исследования инноваций следует отнести совместное использование штрихкодированных пробирок и лабораторно-информационной системы, что максимально сокращает число ручных операций на преаналитическом и аналитическом этапе и повышает эффективность работы.

В практику работы лаборатории внедрена лабораторно-информационная система SaflrLIS (далее – ЛИС). Это единая система, которая может применяться для биохимических, клинических, бактериологических лабораторий. ЛИС способна получать от врачей электронные назначения, передавать задания в анализаторы, автоматически получать результаты с анализаторов и передавать врачам электронные результаты исследований. Программа ранее прошла апробацию в России в сети лабораторий ИНВИТРО. ЛИС готова к решению разных задач по управлению деятельностью медицинской лаборатории. Накопленный опыт работы лабораторий группы ИНВИТРО позволяет полагать, что совместное использование автоматических анализаторов и ЛИС – это инновационная технология, позволяющая более эффективно использовать возможности автоматизации лаборатории. В настоящее время под автоматизацией КДЛ следует подразумевать управление с использованием ЛИС всеми сторонами деятельности лаборатории – технологическими (организация работы автоматизированных аналитических приборов), организационными, учетно-статистическими, финансово-экономическими, а также интеграцию с внешними информационными системами.

Преимущества применения ЛИС:

- сведение к минимуму количества ошибок при проведении исследований и обработке данных;
- ускорение процедуры выполнения исследований;
- обеспечение оперативного доступа к результатам исследований;
- снижение финансовых расходов лаборатории;
- соблюдение требований информационной безопасности;
- повышение эффективности использования лабораторного оборудования;
- уменьшение затрат рабочего времени персонала при подготовке текущей и отчетной документации.

В отделениях медицинского обслуживания Компании пациентам предлагается перечень около 1500 доступных к заказу лабораторных тестов. При оформлении заказа могут возникать сложности. В практику работы ОМО внедрено инновационное решение компании ИНВИТРО – АРМПС (автоматизированное рабочее место процедурной сестры). Это комплекс приложений для оптимизации процесса обслуживания пациентов на рабочем месте администратора или медсестры.

Преимущества его использования:

- до 20% экономии времени оформления заказа;
- до 15% сокращение количества преаналитических ошибок за счет эффективного механизма подсказок;
- возможность дозаказа тестов без повторной процедуры взятия биоматериала;
- полная поддержка процедуры штрихкодирования.

АРМПС позволяет проводить интеграцию с программным обеспечением (ПО) партнеров. Интеграция – внедрение лабораторного модуля в медицинскую информационную систему клиники или в ЛИС партнера Компании. В данном случае интеграция позволяет автоматизировать процесс оформления заказа.

Преимущества интеграции:

- повышение скорости и экономия времени оформления заказа на лабораторные исследования;
- минимизация преаналитических ошибок;
- автоматическое прикрепление результатов лабораторных исследований к электронной карте пациента;
- единая защищенная информационная база.

АРМПС как технологическое решение позволяет эффективно решать задачи, связанные с автоматизацией исследований:

- автоматизирует работу с пациентами;
- повышает скорость и качество обслуживания пациентов;
- минимизирует возможность ошибок при оформлении заказа.

Для проведения общего анализа крови в КДЛ применяются современные автоматические анализаторы, а также инновационные программные разработки, которые позволяют повысить качество лабораторных исследований.

Современный автоматический гематологический анализатор оснащен связующим программным обеспечением типа middleware – это промежуточное программное обеспечение между ЛИС и анализаторами, консолидирующее процессы аналитики образца, подготовки и окраски мазков, их микроскопии, валидации результатов в едином оптимальном рабочем пространстве. Благодаря этому никогда



не пропускается патология. Внедрение программы привело к упрощению алгоритма выполнения общего анализа крови, в основном за счет оптимизации движения информации о полученных результатах [4].

Программа позволяет акцентировать внимание врача клинической лабораторной диагностики именно на патологических образцах. Из общего потока аналитических исследований крови врачу необходимо микроскопировать около 30% его образцов.

Преимущества применения middleware:

- снижение нагрузки на средний медицинский персонал;
- экономия реагентов для окраски мазков;
- минимизация влияния человеческого фактора на качество выполнения исследований;
- возможность отказа от бумажных носителей на территории КДЛ;
- абсолютная прослеживаемость пути пробы в лаборатории;
- оптимизация работы врача клинической лабораторной диагностики, акцент внимания на патологические образцы повышает качество анализа.

Клинико-диагностическая лаборатория также оснащена современными высокотехнологичными биохимическими и иммунохимическими анализаторами с высокой производительностью. Все анализаторы связаны с ЛИС.

Современные анализаторы позволяют решать следующие задачи в аналитическом процессе:

- получение результатов исследований в максимально короткие сроки;
- обеспечение возможности исследования срочных (приоритетных) образцов;
- простота эксплуатации;
- повышение эффективности рабочего процесса;
- полный контроль этапов исследования (калибровка, постановка контролей, исследование проб пациентов), что дает уверенность в результатах;
- снижение расхода реагентов и финансовых затрат.

В практику работы КДЛ внедрен современный программный сервис, который работает в режиме защищенного канала между анализаторами и сервером и служит для поддержания высокой работоспособности и надежности платформ.

Преимущества применения:

- постоянная профессиональная поддержка, увеличивающая время бесперебойной работы анализаторов за счет быстрой диагностики неполадок;
- возможность удаленного проведения электронных обновлений, что значительно оптимизирует процесс работы;
- автоматизированный контроль оборудования.

В практической работе данный сервис позволяет выполнить две основные задачи:

- оценить эффективность расхода реагентов, калибраторов, контрольных материалов;
- оценить эффективность нагрузки на единицу оборудования.

Реализованные программные решения в сочетании с применением ЛИС и штрих-кодирования позволят добиться:

- увеличения эффективности работы;
- обеспечения возрастающих потребностей меньшими ресурсами;
- улучшения качества оказываемой медицинской услуги – лабораторного исследования [8].

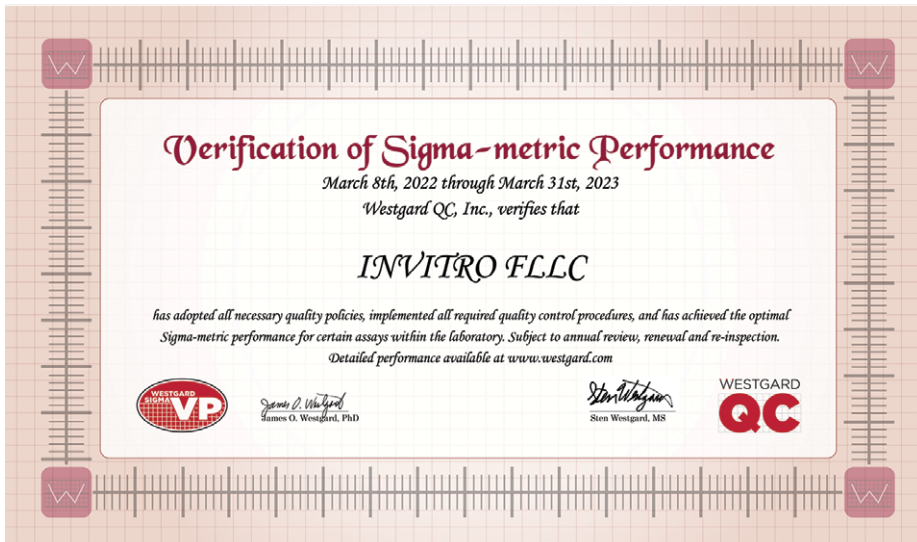
Для врачей и пациентов важнейшим критерием лабораторного исследования является достоверность получаемых при его выполнении данных. Достоверность лабораторного исследования обеспечивается стабильностью работы аналитической системы и системой контроля качества. Проведение в КДЛ контроля качества лабораторных исследований является обязательным и необходимым. В КДЛ процедура контроля качества осуществляется в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.09.2009 № 873 «Об утверждении Инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований», требованиями ISO 15189 «Медицинские лаборатории», а также локальными требованиями ГК ИНВИТРО.

Для проведения процедуры внутрилабораторного контроля качества в КДЛ, как и во всей ГК ИНВИТРО, применялся специальный блок, встроенный в ЛИС. Время показало, что функционал этого блока недостаточен. Кроме того, появились современные инновационные предложения. В настоящее время в практике КДЛ применяется программа, которая используется для ведения внутрилабораторного контроля качества и одновременно является и программой межлабораторного сравнения.

Преимущества использования такого программного продукта:

1. Доступ к данным, полученным от тысяч других лабораторий. Наличие большого количества участников в однородных группах сравнения обеспечивает высокую степень уверенности статистических сравнений.
2. Единство внутрилабораторного и межлабораторного контроля в одном решении.
3. Обнаружение и идентификация потенциальных аналитических ошибок. Программа поможет выявить тренд или сдвиг результатов и узнать, испытывают ли другие лаборатории те же изменения.
4. Получение оперативного сравнения для устранения ошибок.
5. Получение информации о качестве тест-систем из надежного источника.
6. Дополнение программ внешней оценки качества (ВОК). В программе ВОК проверка результатов выполняется периодически (раз в месяц), а в ежедневном контроле качества, дополненном межлабораторными отчетами, проверка правильности результатов доступна для каждой новой постановки контрольного материала. Приемлемые результаты в день измерения образцов ВОК не дают гарантии ежедневной надежности исследований, потому что ошибки в тест-системе могут произойти в любое время.
7. Программа позволяет проводить сравнения для аналитов, которые недоступны в программах ВОК.
8. Соответствие требованиям аккредитации и нормативных документов. Программа помогает соответствовать требованиям стандарта ИСО 15189.
9. Источник опорных значений для новых лотов контрольного материала. Значения в программе доступны как для аттестованных, так и для неаттестованных контрольных материалов. Они постоянно обновляются и отражают результаты измерения аналита с учетом реагентов, доступных в настоящее время [7].

Данная программа позволяет реализовать расчет диапазона общей допустимой ошибки, сигматрии, автоматического выбора правил Вестгарда для выбранной методики. С 2019 г. КДЛ принимает участие в процедуре аттестации Международной программы верификации и оценки качества «Шесть сигм» Westgard QC и в ноябре 2019 г. получила первый сертификат соответствия качества уровню шести сигм



Сертификат аттестации лаборатории ИНВИТРО (Беларусь) Международной программы верификации и оценки качества «Шесть сигм» Westgard QC
Certificate of Attestation of the INVITRO (Belarus) Laboratory of the International Six Sigma Quality Verification and Assessment Program Westgard QC

по 24 биохимическим тестам, обновляемый ежегодно по результатам работы. Сертификат представлен на рисунке.

Шесть сигм (англ. Six sigma) – это один из методов управления процессами, основанный на проведении статистической оценки фактов, данных процесса, систематическом поиске и разработке мероприятий по повышению уровня выхода годной продукции, их последовательному внедрению и последующему анализу безошибочности процессов для увеличения удовлетворенности клиентов [9].

Шесть сигм – это понятие из теории вероятности, выраженное формулой: не более 3,4 дефекта на миллион продукции или процессов. Математическая задача методологии – уменьшить рассеивание вариантов. То есть в буквальном смысле Шесть сигм – это методология управления проектами, ориентированная на минимизацию брака в производственном процессе [11].

Преимущества метода «Шесть сигм»:

- устранение или снижение всех вариаций в процессе (вариации приводят к потерям времени и ресурсов на повторные тестирования);
- создание процесса с минимизированной величиной вариации, такой, чтобы от истинного значения до предела спецификации вмещалось до 6 стандартных отклонений.

Использование концепции «Шесть сигм» с одновременным применением программы контроля качества для КДЛ обеспечивало:

- стандартную оценку качества и эффективности лабораторных процессов (шкала «Шесть сигм»);

- проведение планирования ВЛК и выбор общей стратегии проведения ВЛК;
- эффективную оценку количества повторных исследований анализа при проведении диагностического тестирования;
- оптимизацию работы персонала медицинской лаборатории.

Это означает, что система обеспечения качества биохимических лабораторных исследований КДЛ Компании находится на уровне ведущих мировых лабораторий, погрешности статистически возможны в 3,4 случая из миллиона.

Совместная реализация инновационных программ контроля качества в практике работы КДЛ позволяет достигнуть высокого, международного уровня качества исследований, что в свою очередь значительно влияет на повышение качества медицинских услуг.

На стадии доставки результатов исследований пациентам Компания предлагает несколько вариантов решений:

- в личном кабинете на сайте www.invitro.by;
- по телефону при обязательном озвучивании кодового слова;
- по электронной почте (по предварительной заявке);
- в любом из отделений медицинского обслуживания (на печатном бланке).

Пациентам предлагается услуга получения бесплатного SMS-уведомления о полной готовности результатов исследований. Для того чтобы воспользоваться услугой, пациенту при обращении в любой медицинский офис достаточно сообщить администратору номер телефона.

Доставка результатов исследований по электронной почте: сообщения отправляются автоматической системой доставки результатов без участия человека с момента полной готовности всех заказанных лабораторных исследований согласно заявленным срокам. Результаты исследований содержатся в сообщении в виде ссылки на страницу в личном кабинете на сайте ИНВИТРО либо в виде вложенного файла в формате Adobe PDF и являются точной копией бумажных бланков ответа исполнителя [5].

В 2012 г. компания ИНВИТРО впервые опубликовала мобильное приложение «Личный кабинет ИНВИТРО» (мобильный аналог веб-кабинета). Приложение позволяет получать результаты анализов в кратчайшие сроки благодаря интеграции с единой базой данных, сохранять в формате pdf или в один клик отправлять результаты на электронную почту лечащему врачу. Приложение дает возможность найти ближайшее ОМО, узнать расписание его работы и получить информацию о дополнительных услугах, проложить кратчайший маршрут от текущего местоположения.

Приложение содержит справочник, включающий информацию о более чем 1700 видах медицинских исследований. В справочнике можно найти подробные сведения обо всех лабораторных тестах, выполняемых Компанией: описание показателей, показания для назначения, референсные значения в зависимости от возраста, пола и физического состояния, а также актуальные цены на все услуги. В приложении работает поиск по названию исследования и группам анализов, доступных в выбранном медицинском офисе.

Приложение постоянно дорабатывается. Из последних обновлений следует отметить:

- добавленный раздел «Динамика результатов», приложение строит график, отражающий изменения в результатах исследований за три месяца;



- единую учетную запись для веб-кабинета ИНВИТРО и мобильного приложения. Доступна авторизация через социальные сети (VK, Facebook) [6].

Разработки в области информационных технологий в медицине значительно упрощают доступ к актуальной информации, что в настоящее время имеет важное значение как для пациентов, так и для медицинских сотрудников. Скорость и доступность получения результатов часто приобретают большое значение при обращении пациентов за медицинской услугой.

Одно из последних инновационных решений лежит в реализации менеджмента рисков в соответствии с ISO 15189 Раздел 4.14.6: Управление рисками: Лаборатория должна проводить оценку влияния рабочих процессов и возможных недостатков на результаты исследований, т. к. они влияют на безопасность пациента, и должна изменять процессы, чтобы снизить или устранить выявленные риски и задокументировать решения и предпринятые действия [2].

В данном случае риск следует понимать как вероятность того, что какие-либо действия (или бездействие) могут с определенной степенью выраженности негативно сказаться на состоянии здоровья пациента. Необходимость управления рисками в лаборатории вызвана:

- анализом множества образцов биоматериала, большим объемом клинических данных;
- тем, что данные лабораторных исследований напрямую влияют на принятие клинических решений, соответственно – на здоровье пациентов;
- все анализируемые образцы имеют некоторые переменные компоненты: те, которые возможно контролировать; те, которые трудно контролировать, а также те, которые невозможно ни предвидеть, ни контролировать;
- независимо от участия в организационных мероприятиях, лабораторию зачастую считают источником проблемы [12].

Риски могут возникать на всех этапах процесса лабораторного анализа. Каждый риск-фактор (ошибки, ведущие к реализации рисков) в свою очередь имеет несколько причин возникновения. В группе ИНВИТРО был сформирован реестр рисков и риск-факторов, которые могут возникнуть в работе КДЛ. Было разработано, протестировано и внедрено в практику работы специальное программное приложение – инструмент для регистрации всех несоответствий в лабораторном процессе: преаналитических, аналитических и постаналитических ошибок. Для регистрации случаев нарушений рабочего процесса используются стандартизованные формулировки ошибок.

Система управления рисками была введена в работу в ноябре 2019 г. Регистрация причин и дальнейший их анализ позволяет оценить уровень эффективности имеющихся мероприятий, направленных не на недопуск ошибок, а на оценку качества работы подразделения в целом. Система управления рисками является частью управления и направлена на обеспечение стабильно высокого уровня качества, удобства и безопасности оказываемых услуг для пациента, персонала и Компании в целом, что достигается постоянным отслеживанием и системным воздействием на негативные ситуации.

Описанные инновационные решения направлены на улучшение процесса лабораторного анализа – основного вида деятельности ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», и, как следствие, – на достижение высокого качества лабораторных

исследований. Все эти решения позволяют эффективно реализовывать преимущества централизованной автоматизированной технологической площадки:

- снижение времени выполнения анализов;
- резкое повышение качества выполняемых исследований;
- снижение себестоимости выполняемых анализов;
- увеличение эффективности работы;
- увеличение пропускной способности без дополнительных анализаторов;
- увеличение безопасности персонала;
- уменьшение числа ошибок.

Современное оборудование позволяет не только расширить диапазон исследований, но и повысить качество оказываемых услуг, а следовательно – качество оказания лечебно-диагностической помощи населению, что в свою очередь будет способствовать повышению эффективности работы лаборатории и более полному удовлетворению запросов населения.

Инновационная деятельность холдинга ИНВИТРО

В сфере инновационных интересов ИНВИТРО находятся технологии в области информационных технологий, мобильного здравоохранения, образования, логистики и новых технологий лабораторной и инструментальной диагностики.

В Компании ведется активная работа по разработке и внедрению логистического продукта, предназначенного для контроля транспортировки биологического материала из ОМО в КДЛ.

В 2015 г. ИНВИТРО апробировала использование беспилотной авиации в отрасли здравоохранения – логистическое решение, которое в перспективе может оказать существенное влияние на развитие лабораторной диагностики со сложной транспортной доступностью.

В 2013 г. практические изыскания Компании в области инновационных технологий привели к открытию в Москве первой в России частной лаборатории биотехнологических исследований 3D Bioprinting Solutions, основным инвестором которой выступила ИНВИТРО. Деятельность лаборатории – разработка и производство биопринтеров и материалов в области трехмерной биопечати, разработка новых технологий в биофабрикации. Сегодня 3D Bioprinting Solutions является одним из лидеров в области трехмерной биопечати. Компания создала первый российский биопринтер собственной оригинальной конструкции Fabion и первой в мире напечатала и осуществила успешную трансплантацию органного конструкта щитовидной железы мыши. В 2017 г. 3D Bioprinting Solutions и ИНВИТРО заключили соглашение с госкорпорацией «Роскосмос», закрепившее договоренность о доставке в 2018 г. космического магнитного биопринтера, разработанного лабораторией биотехнологических исследований, на борт международной космической станции для проведения серии научных экспериментов [10].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный уровень технологий и технический прогресс диктуют новые направления развития. Внедрение инновационных технологий позволяет сформировать новые возможности расширения рынка и доступности услуг, в том числе и в отрасли здравоохранения. Повышению эффективности медицинской помощи



способствует непрерывный поступательный процесс обновления медицинских технологий.

ИООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО» поддерживает современные тенденции и внедряет в свою практику передовые технологии и инновационные решения, реализуемые во всей группе компаний ИНВИТРО. Используется весь доступный потенциал холдинга. Целенаправленно и последовательно развивается автоматизация операций, сводящая к минимуму человеческий фактор на всех этапах исследования, сотрудники лабораторий участвуют только в тех частях технологической цепочки, где их физически невозможно заменить робототехникой или компьютерными системами.

Внедряются готовые инновационные решения, предлагаемые партнерами холдинга, которые имеют мировую известность и заслуженную репутацию в медицине. Ведутся разработки и активно внедряются собственные инновации.

Активная позиция Компании по внедрению инновационных решений является существенной составляющей в повышении качества предоставляемых медицинских услуг. В то же время реализация инноваций является важной частью эффективности деятельности Компании в целом и позволяет успешно конкурировать на рынке в области лабораторной диагностики.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Law of the Republic of Belarus No. 2105-XII of 19.01.1993 "On the fundamentals of State Scientific and Technical Policy"*. (in Russian)
2. *State standard STB ISO 15189-2015 (ISO 15189-2012, IDT) "Medical laboratories. Quality and competence requirements"*. (in Russian)
3. Novikova I., Prokopovich A. *Clinical biochemistry Fundamentals of laboratory analysis*. Gomel, Gomel State Medical University. 2011:46–47. (in Russian)
4. Belova Ya., Nurgaliev K., Baidaletova G. *Experience of using automatic hematological analyzers in a clinical diagnostic laboratory*. (in Russian)
5. *Delivery of results*. Available at: <https://invitro.by/analizes/for-doctors/poluchenie-rezultatov/> (in Russian)
6. *INVITRO in your mobile*. Available at: <https://invitro.by/about/publicity/1305/11102/> (in Russian)
7. *Unity Interlaboratory Comparison Program*. Available at: <https://www.qcnet.com/Portals/89/PDFs/Q-1144Unity-Ru.pdf?ver=2018-12-27-020503-747> (in Russian)
8. *Increase the uptime of equipment with Predictive Alerts from Abbott*. Available at: corelaboratory.abbott/AlinIQ
9. *Encyclopedia of the production manager*. Available at: <http://www.up-pro.ru/encyclopedia/six-sigma.html> (in Russian)
10. *INVITRO. Innovation policy*. (in Russian)
11. *Six Sigma is it? Proext kak process or process kak proext*. Available at: <https://worksection.com/blog/six-sigma.html> (in Russian)
12. Oksha T. *Risk management in the medical laboratory*. Available at: <http://www.iso15189.ru/data/documents/Risk-Management-Tyumen.pdf> (in Russian)



Чиркин А.А.✉, Алтани М.С., Степанова Н.А., Чиркина А.А.
Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь

Изменения биохимических показателей сыворотки крови у подростков женского пола при занятиях спортом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование текста – Чиркин А.А.; создание базы данных и обработка материала – Алтани М.С.; написание текста – Степанова Н.А.; статистическая и компьютерная обработка материала – Чиркина А.А.

Подана: 22.06.2022
Принята: 05.09.2022
Контакты: chir@tut.by

Резюме

Цель. Анализ показателей оценки состояния обменных процессов у подростков-спортсменов женского пола в пубертатном периоде их жизни с использованием применяемых в медицинских организациях лабораторных тестов для выявления рисков развития метаболических изменений, сопровождающихся формированием синдрома относительного дефицита энергии в спорте и предвестников развития метаболического синдрома.

Материалы и методы. Проанализирована обезличенная база данных, включающая 31 биохимический маркер здоровья 371 подростка женского пола (323 спортсменки и 48 подростков контрольной группы). Представлены данные о биохимических показателях риска развития синдромов напряжения метаболических процессов в зависимости от периода пубертатного возраста, спортивной квалификации и видов спорта.

Результаты. Занятия спортом в подростковом периоде сопряжены с более частым выявлением гипотрофии, проявляющейся чаще у девушек в рамках комплекса симптомов «триады женщин-атлеток», которая включает в себя недостаточное потребление энергии с нарушением питания (или без него), менструальную дисфункцию и снижение минеральной плотности костной ткани. По мере преодоления возрастающих спортивных нормативов в раннем пубертатном возрасте к биохимическим показателям энергетического обеспечения спортивной деятельности (снижение уровней глюкозы, ХС-ЛПНП, содержания альбумина, активности щелочной фосфатазы, величины коэффициента «АсАТ/АлАТ», повышение коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП») добавляется снижение ОЖСС, имеющей отношение к менструальному циклу, а также показатели повреждения мембранных структур (АлАТ, АсАТ, КФК, ЩФ). Установлено, что для циклических видов спорта характерно снижение уровней глюкозы, ОЖСС и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для скоростно-силовых видов спорта – снижение содержания альбумина, триглицеридов и ОЖСС; для спортивных единоборств – снижение ОЖСС и показателей коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для сложно-координационных видов спорта – снижение уровня триглицеридов и



коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП». Концентрация общего кальция сохраняется на постоянном уровне, что не позволяет использовать этот показатель в предсказании развития остеопороза. Отбор спортсменов с факторами риска метаболического синдрома практически завершается после двух первых этапов оценки избыточной массы тела и уровня ХС ЛПВП. Вспомогательную роль играют содержание глюкозы и триглицеридов.

Заключение. Биохимические показатели риска развития синдрома «относительно-го дефицита энергии» чаще выявляются у спортсменок раннего пубертатного возраста, что может привести к патологическим компонентам «триады женщин-атлетов». Большую роль в развитии метаболического синдрома у небольшой части (0,4–1,8%) спортсменок пубертатного возраста играют избыточная масса тела и снижение уровня липопротеинов высокой плотности.

Ключевые слова: пубертатный период, занятия спортом, подростки женского пола, синдром относительного дефицита энергии, метаболический синдром

Chirkin A.✉, Altani M., Stepanova N., Chirkina A.
Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus

Changes in Biochemical Indicators of Blood Serum in Female Adolescents During Sports

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study, text editing – Chirkin A.; database creation and material processing – Altani M.; text writing – Stepanova N.; statistical and computer processing of the material – Chirkina A.

Submitted: 22.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: chir@tut.by

Abstract

Purpose. Analysis of indicators for assessing the state of metabolic processes in adolescent female athletes in the puberty period of their life using laboratory tests used in medical organizations to identify the risks of developing metabolic changes accompanied by the formation of a "relative energy deficit syndrome in sports" and precursors of the development of "metabolic syndrome".

Materials and methods. An impersonal database was analyzed, including 31 biochemical markers of health of 371 female adolescents (323 athletes and 48 adolescents in the control group). Data on biochemical indicators of the risk of developing stress syndromes of metabolic processes depending on the period of puberty, sports qualifications and sports are presented.

Results. Participation in sports during adolescence is associated with a higher incidence of malnutrition, which is more common in girls as part of the symptom complex of the triad of female athletes, which includes insufficient energy intake with or without malnutrition, menstrual dysfunction, and a decrease in bone mineral density. As the increasing sports standards are overcome at early puberty, the biochemical indicators of the energy supply of sports activities (decrease in glucose levels, LDL-cholesterol, albumin content, alkaline

phosphatase activity, the value of the "AST / ALT" coefficient, increase in the coefficient "glucose / cholesterol-LDL") are added a decrease in TIBC (Total iron-binding activity of serum) related to the menstrual cycle, as well as indicators of damage to membrane structures (ALT, AST, CPK, alkaline phosphatase). It has been established that cyclic sports are characterized by a decrease in glucose levels, TIBC, and the coefficient "glucose/LDL-cholesterol"; for speed-strength sports - a decrease in the content of albumin, triglycerides and TIBC; for martial arts - a decrease in TIBC and indicators of the coefficient "glucose / cholesterol-LDL"; for complex-coordinating sports - a decrease in the level of triglycerides and the coefficient "glucose / LDL cholesterol". The concentration of total calcium remains at a constant level, which does not allow using this indicator in predicting the development of osteoporosis. The selection of athletes with risk factors for the metabolic syndrome is practically completed after the first two stages of assessing overweight and HDL cholesterol levels. An auxiliary role is played by the content of glucose and triglycerides.

Conclusion. Biochemical indicators of the risk of developing the syndrome of relative energy deficiency are more often detected in female athletes of early puberty, which can lead to pathological components of the triad of female athletes. An important role in the development of the metabolic syndrome in a small part (0.4-1.8%) of female athletes of puberty is played by overweight and a decrease in the level of high density lipoproteins.

Keywords: puberty, sports, female adolescents, relative energy deficiency syndrome, metabolic syndrome

■ ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь половое созревание у девочек начинается в 10–11 лет, в 12–13 лет наступает менструация, процесс полового созревания заканчивается в среднем в 13–18 лет [1]. Половое созревание (пубертатный период, пубертат) – процесс изменений в организме подростка, вследствие которых он становится взрослым и способным к продолжению рода. В этом периоде прирост массы тела у подростков женского пола составляет 25 кг с годовыми колебаниями прироста от 5,5 кг до 10,5 кг и увеличение роста на 24,5 см с годовыми колебаниями от 6 см до 10,5 см [2]. В последние десятилетия на процессы полового созревания накладываются занятия спортом с целью достижения высоких результатов. В 2018 г. была предложена классификация возрастных периодов у спортсменов. Выделяют первый спортивный возраст (3–6 лет), предпубертатный спортивный возраст (7–11 лет), первый (ранний) пубертатный спортивный возраст (12–15 лет), второй (поздний) пубертатный спортивный возраст (16–18 лет), возраст спортивной зрелости (19–35 лет) [3].

У спортсменок часто встречается так называемая триада женщин-атлетов (the female athlete triad), которая включает в себя три компонента: недостаточное потребление энергии с нарушением питания или без него, менструальную дисфункцию и снижение минеральной плотности костной ткани [4]. Частота ее, по данным разных авторов, колеблется в диапазоне 1–54% в зависимости от проявляющихся компонентов и вида спорта [5, 6]. В циклических видах спорта практически каждая пятая спортсменка имеет ее симптомы [7]. Впервые триада описана в 1997 г. специалистами Американского колледжа спортивной медицины. В 2005 г. рабочей группой Международного олимпийского комитета введено более широкое понятие, описывающее



негативное влияние занятий спортом на организм спортсменов обоих полов: синдром относительного дефицита энергии в спорте (relative energy deficiency in Sport, RED-S). Этот синдром включает в себя изменения основного обмена, менструальной функции, состояния костной, сердечно-сосудистой и иммунной систем, вызванные относительным дефицитом энергии. Причиной этого синдрома является дефицит энергии по отношению к балансу между потреблением энергии с пищей и ее расходом, необходимыми для сохранения здоровья и занятий спортом. Таким образом, триада – это проявления RED-S, которые негативно влияют на многие физиологические аспекты женского здоровья и спортивные результаты; в тяжелых случаях они могут привести к клиническим расстройствам пищевого поведения, аменорее и остеопорозу. Уменьшение минеральной плотности костной ткани у спортсменок является важным фактором риска развития стрессовых (спортивных) переломов, которые сложны в диагностике и лечении и в некоторых случаях могут стать причиной окончания спортивной карьеры. Нерегулярные менструации, или аменорея, продолжающиеся в течение нескольких лет, оказывают негативное влияние на костную ткань и в долгосрочной перспективе могут приводить к развитию остеопороза [8]. Дефицит энергии снижает гипоталамическое пульсирующее высвобождение гонадотропин-рилизинг факторов, что ухудшает высвобождение гонадотропинов передней долей гипофиза. У женщин сниженная пульсация секреции в кровь фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов вызывает гипоэстрогению, вызывающую функциональную гипоталамическую аменорею и снижение костной массы. Кроме того, изменяются сигнальные пути гормонов щитовидной железы, уровней лептина в крови, показателей углеводного обмена, оси «гормон роста / инсулиноподобный фактор роста-1» и симпатический/парасимпатический тонус [9]. Обнаружено сходство симптомов между тренировочной перегрузкой (с диагнозом синдрома перетренированности или без него) и относительным дефицитом энергии в спорте (RED-S) [10]. Вариантом таких нарушений обмена веществ может быть развитие метаболического синдрома у спортсменок, появлению которого, по данным Европейской программы «HELENA study», могут препятствовать занятия дозированными физическими нагрузками [11].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ показателей оценки состояния обменных процессов у подростков-спортсменок женского пола в пубертатном периоде их жизни с использованием применяемых в медицинских организациях лабораторных тестов для выявления рисков развития метаболических изменений, сопровождающихся формированием синдрома относительного дефицита энергии в спорте и предвестников развития метаболического синдрома.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с одобрением этической комиссии Витебского государственного университета (ЭК-20.1) была создана и проанализирована неперсонализированная (обезличенная) база данных, включающая возраст, пол, индекс массы тела, спортивную квалификацию и 31 биохимический маркер сыворотки крови. Материал собирался на протяжении 2011–2019 гг. при обследовании 4 групп подростков женского (7–11 лет, 12–15 лет, 16–18 лет и 19–20 лет) пола согласно программе мероприятий,

принятых в Витебском областном диспансере спортивной медицины (Республика Беларусь). Все обследуемые лица входили в организованные группы, обследовались в присутствии тренера и врача и сдавали кровь добровольно. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 г., с изменениями в период 1975–2008 гг.) с учетом международных норм и стандартов. Изменения биохимических маркеров здоровья при занятиях олимпийскими видами спорта в период полового созревания оценивались с учетом положений, регламентированных законом Республики Беларусь «О здравоохранении» от 18.06.1993 г. № 2435-XII, статья 46.

В обезличенную базу были введены данные 371 подростка женского пола, в том числе 323 спортсменок и 48 подростков, составивших контрольную группу. Биохимические исследования сыворотки крови подростков производились на базе лаборатории Витебского областного диагностического центра по методам, описанным ранее [12].

Статистическую обработку цифрового материала производили методами параметрической и непараметрической статистики (Statistica 10.0, StatSoft inc.). Множественное сравнение групп выполнялось с помощью критерия Краскела – Уоллиса. Если этот критерий показывал, что имеются различия между группами, то затем выполнялось попарное сравнение групп с помощью U-критерия Манна – Уитни. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0,05$, при попарном сравнении учитывалась поправка Бонферрони ($p < 0,01$). Результаты представлены в виде $M \pm m$ или медианы и процентилей (Me (25%–75%)).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно канадскому проекту КАЛИПЕР, нацеленному на создание и поддержание базы данных современных педиатрических референсных интервалов для биохимических показателей сыворотки крови, в подростковом возрасте в сыворотке (плазме) крови уменьшается концентрация фосфатов и активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы. Содержание креатинина, а также концентрации общего холестерина, триглицеридов, мочевой кислоты и мочевины увеличивались. Снижение концентрации кальция и фосфатов в сыворотке крови отображает созревание костной ткани. У девочек на этапе полового созревания и появления менструаций возможно уменьшение концентрации альбумина сыворотки крови. Активность лактатдегидрогеназы наиболее высокая в детском возрасте при усиленном обновлении и росте тканей и затем уменьшается. Аналогичные изменения касаются щелочной фосфатазы и созревания костной ткани. Концентрация почечных маркеров в сыворотке крови (креатинина, мочевины и мочевой кислоты) увеличивается с возрастом. Количество креатинина, ежедневно производимого при распаде креатина в мышцах, коррелирует с увеличением мышечной массы. Точно так же уровни мочевины связаны с «деградацией» белка. Верхний предел мочевой кислоты для мужчины и женщины в 13 лет соответствует установленным пороговым значениям гиперурикемии. Повышение концентрации общего холестерина и ЛПНП (ХС-ЛПНП) от раннего детства до взрослой жизни может указывать на растущие потребности в них для синтеза стероидных гормонов, связанных с ростом и развитием. Содержание ЛПВП (ХС-ЛПВП) снижается с возрастом у мужчин, но фактически



увеличиваются у женщин. Это связано с ролью эстрогенов в модуляции содержания ЛПВП (ХС-ЛПВП) в крови. Концентрация глюкозы поддерживается на относительно постоянном уровне с участием механизмов регуляции концентрации инсулина и глюкагона на протяжении суток [13].

Для оценки региональных особенностей возрастной динамики биохимических показателей в таблице представлены данные обследования подростков Белорусского Поозерья. Для однотипности сравнения полученных результатов был использован параметрический способ статистической обработки цифрового материала. При половом созревании подростков мужского пола в сыворотке их крови отмечено увеличение содержания билирубина, креатинина, общего белка, мочевой кислоты и триглицеридов в позднем пубертатном периоде. Эти изменения сохраняются во взрослом состоянии и могут свидетельствовать о «созревании» систем биосинтеза транспортных белков, процессов распада эритроцитов и образования билирубина, «укрепления» системы эндогенных антиоксидантов и долгосрочных резервов энергии. В то же время у подростков мужского пола снижается уровень содержания в сыворотке крови общего холестерина, ХС ЛПВП и ХС ЛПНП, что указывает на возможность интенсивного использования холестерина для синтеза стероидных гормонов, и прежде всего половых. Кроме того, уменьшается активность циркулирующей в крови щелочной фосфатазы, что обычно наблюдается при завершении роста и развития скелета.

У подростков женского пола в позднем пубертате увеличивается содержание в сыворотке крови только общего белка и мочевой кислоты, на фоне снижения содержания ХС-ЛПНП и величины холестеролового коэффициента атерогенности, а также активности щелочной фосфатазы и аспартатаминотрансферазы. По всей вероятности, такие изменения означают, что половое созревание произошло раньше, но траты холестерина на синтез стероидных гормонов еще не компенсированы.

Констатировано, что в возрастном интервале 7–20 лет у лиц женского пола, включенных в обезличенную базу данных, ИМТ увеличивается с 17,2 (16,4–18,4) кг/м² до 22,7 (21,6–25,2) кг/м². Причем в процессе пубертата величина ИМТ нарастает скачкообразно в возрастной группе 16–20 лет. На протяжении этого периода у подростков женского пола не изменяется содержание триглицеридов, мочевины, общего белка, альбумина, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, показатели индекса атерогенности, активность КФК, альфа-амилазы, концентрация калия, кальция, железа, величины ОЖСС, коэффициентов КФК/АсАТ, глюкоза/ХС-ЛПВП, глюкоза/ХС-ЛПНП. Вместе с тем обнаружено характерное уменьшение уровня мочевой кислоты – с 320 (280–320) мкмоль/л до 170 (170–210) мкмоль/л, активности щелочной фосфатазы – с 239 (200–876) Ед/л до 130 (124–143) Ед/л и нарастание коэффициента АсАТ/АлАТ – с 0,84 (0,80–0,91) ед. до 1,52 (1,33–1,98) ед. Перечисленные показатели характеризуют процессы обмена веществ на протяжении всего пубертатного периода жизни подростков женского пола. Кроме того, выявлены некоторые биохимические особенности для отдельных периодов пубертатного возраста. Так, в возрастной группе 12–15 лет содержание глобулинов увеличивается до 30 (26–33,5) г/л, уменьшается величина коэффициента альбумин/глобулины до 1,46 (1,28–1,65) ед.; в возрастной группе обследованных 16–18 лет уменьшается содержание глюкозы – до 4,39 (4,10–4,75) ммоль/л, но увеличивается уровень общего холестерина – до 5,04 (5,00–5,30) ммоль/л, а также уменьшается величина коэффициента глюкоза/ОХС до 0,86 (0,81–0,91) ед.

Возрастная динамика биохимических показателей сыворотки крови у жителей Белорусского Поозерья в периоде полового созревания
Age-related dynamics of biochemical parameters of blood serum in residents of the Belarusian Poozerie during puberty

| Показатели | Возрастные интервалы, годы | | | | | |
|--------------|----------------------------|-----------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | <15 (ранний пубертат) | | 15–19 (поздний пубертат) | | 20–24 (взрослые) | |
| | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины |
| Мочевина | 5,26±0,12 | 5,20±0,09 | 5,49±0,14 | 5,30±0,14 | 5,55±0,13 | 5,22±0,12 |
| Билирубин | 8,59±0,18 | 8,66±0,16 | 11,0±0,22 ¹ | 8,58±0,17 | 11,3±0,53 ¹ | 9,88±0,49 ² |
| Глюкоза | 4,68±0,04 | 4,68±0,04 | 4,73±0,06 | 4,77±0,04 | 4,84±0,06 ¹ | 4,73±0,05 |
| Креатинин | 74,5±1,29 | 73,8±1,61 | 86,7±2,23 ¹ | 75,2±2,49 | 87,2±2,84 ¹ | 76,0±2,64 |
| Белок | 73,0±0,44 | 74,1±0,44 | 76,0±0,46 ¹ | 75,9±0,51 ² | 76,9±0,54 ¹ | 75,3±0,66 |
| Мочевая к-та | 264±8,21 | 230±7,44 | 321±7,87 ¹ | 254±8,92 ² | 334±6,81 ¹ | 266±7,18 ² |
| ОХС | 4,32±0,04 | 4,44±0,04 | 4,09±0,04 ¹ | 4,37±0,05 | 4,52±0,05 ¹ | 4,53±0,05 ² |
| ХС ЛПВП | 1,31±0,02 | 1,40±0,02 | 1,24±0,01 ¹ | 1,45±0,02 | 1,28±0,02 | 1,47±0,02 ² |
| Триглицериды | 0,95±0,02 | 0,91±0,02 | 1,07±0,02 ¹ | 0,88±0,02 | 1,28±0,03 ¹ | 0,96±0,02 |
| ХС ЛПНП | 2,70±0,04 | 2,78±0,04 | 2,48±0,03 ¹ | 2,63±0,05 ² | 2,81±0,04 | 2,75±0,05 |
| ИА | 2,44±0,05 | 2,26±0,04 | 2,41±0,04 | 2,08±0,05 ² | 2,75±0,06 ¹ | 2,18±0,05 |
| ГГТ | 23,1±1,12 | 17,8±1,04 | 22,6±1,18 | 16,9±1,09 | 27,1±0,92 ¹ | 18,5±1,18 |
| ЩФ | 274±10,0 | 219±12,9 | 159±10,5 ¹ | 99,9±4,26 ² | 95,0±4,43 ¹ | 76,7±1,98 ² |
| АсАТ | 35,0±0,76 | 34,0±1,00 | 33,7±1,36 | 28,0±0,93 ² | 37,2±1,66 | 29,4±1,19 ² |
| АлАТ | 24,4±0,70 | 23,0±0,73 | 25,9±1,29 | 21,2±0,76 | 31,3±0,81 ¹ | 24,4±1,05 |

Примечания:

В каждой группе обследовано от 100 до 600 человек; значения показателей представлены в виде М±m.

Мочевина – ммоль/л, билирубин общий – мкмоль/л, глюкоза – ммоль/л, креатинин – мкмоль/л, белок общий – г/л, мочевая кислота – мкмоль/л, ОХС – общий холестерол – ммоль/л, ХС-ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности – ммоль/л, триглицериды – ммоль/л, ИА – индекс атерогенности – (ОХС – ХС-ЛПВП/ХС-ЛПНП) – ед., ГГТ – гамма-глутамил-транспептидаза, ЩФ – щелочная фосфатаза, АсАТ – аспаратаминотрансфераза и АлАТ – аланинаминотрансфераза (Ед/л).

¹ P<0,05 при сравнении с показателями группы «мужчины» (ранний пубертат);

² P<0,05 при сравнении с показателями группы «женщины» (ранний пубертат).

У 38,2% спортсменок в возрасте до 15 лет выявлена гипотрофия (ИМТ <18,5 кг/м²). Нормальная масса тела констатирована у 55,8% спортсменок (18,6–24,9 кг/м²). У спортсменов мужского пола гипотрофия в этом возрасте была выявлена в 24,7% случаев, а нормальная масса тела отмечена у 67,9%. Следовательно, занятия спортом в подростковом периоде сопряжены с более частым выявлением гипотрофии, проявляющейся чаще у девушек, вероятно, в рамках комплекса симптомов «триады женщин-атлеток». Кроме того, можно отметить, что у юношей состояние гипотрофии выявляется в 6,4 раза, а у девушек – в 10,3 раза чаще, по сравнению с ее встречаемостью у взрослых спортсменов. Нормальная масса тела у девушек встречается в 1,5 раза реже по сравнению со взрослыми. Избыточная масса тела зарегистрирована в 3,5 раза чаще у взрослых спортсменов-мужчин по сравнению с подростками, тогда как у взрослых женщин-спортсменок избыточная масса тела встречается всего лишь в 1,5 раза чаще по сравнению с подростками. Приведенные данные обращают внимание на то, что, во-первых, занятия спортом в подростковом периоде сопряжены с более частым выявлением гипотрофии, а во-вторых, существенно больше взрослых мужчин-спортсменов относятся к диапазонам «избыточная масса тела» и «ожирение».



Таким образом, из всех полученных результатов целесообразно выделить те, которые могли бы свидетельствовать о возможном развитии триады женщин-атлеток и метаболического синдрома у занимающихся спортом в периоде полового созревания.

Синдром RED-S

Для установления показателей лабораторных тестов, способных указывать на развитие триады женщин-атлеток, был проведен анализ полученных биохимических данных у подростков женского пола, занимающихся спортом, по сравнению с незанимающимися спортом [12]. Установлено, что у девочек-спортсменок в возрастной группе 7–11 лет имеет место статистически достоверное снижение уровней мочевины, мочевой кислоты, альбумина, коэффициента «альбумин/глобулины» и повышение активности АсАТ и коэффициента «АсАТ/АлАТ». Такие изменения в связи с наличием гипотрофии могут свидетельствовать о возможном развитии синдрома энергетической недостаточности. В возрастной группе 12–15 лет у девочек-спортсменок оказались сниженными уровни глюкозы, ХС-ЛПНП, содержание альбумина, активность щелочной фосфатазы, величины коэффициента «АсАТ/АлАТ», но повышена величина коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП». Эти изменения сопряжены с повышением величины ИМТ по отношению к его контрольным значениям. Анализируя эти изменения, можно предположить, что связанное с систематическими физическими нагрузками увеличение массы тела требует относительно большего использования глюкозы как транспортной формы энергии. Это может привести к алиментарной недостаточности энергетического обеспечения спортсменок, что может проявиться в будущем в виде первого компонента триады женщин-атлеток. В возрастной группе 16–18 лет снижено содержание ОХС, но повышены уровни общего билирубина, активности АсАТ и величины коэффициентов «глюкоза/ОХС» и «глюкоза/ХС-ЛПВП». Эти изменения подтверждают, что в данном возрастном периоде глюкоза играет ведущую роль в энергетическом обеспечении спортсменок. В постпубертатном возрасте индекс массы тела у спортсменок оказался ниже по сравнению с незанимающимися спортом при повышении уровней билирубина и мочевой кислоты как продуктов усиленного катаболизма гемсодержащих белков и нуклеиновых кислот.

На втором этапе исследования синдрома RED-S был произведен поиск информативных диагностических биохимических показателей метаболического статуса подростков в зависимости от их спортивной квалификации [14]. Показано, что у девушек-спортсменок возрастной группы 12–15 лет, имеющих юношеские спортивные разряды, повышены величины ИМТ, а также снижено содержание мочевины, креатинина, ОХС, ХС-ЛПНП, активности щелочной фосфатазы и ОЖСС по сравнению с контролем, а также повышены показатели активности АсАТ, щелочной фосфатазы и значения коэффициентов «глюкоза/ОХС» и «глюкоза/ХС-ЛПНП». Следовательно, для достижения юношеских разрядов необходимо наличие энергетического обеспечения спортивной деятельности преимущественно за счет глюкозы с алиментарным путем поступления. У подростков, преодолевших планки спортивных разрядов взрослых, повышены значения ИМТ на фоне снижения содержания глюкозы и триглицеридов, а также альбумина, величины индекса атерогенности, ХС-ЛПНП, ОЖСС и активности щелочной фосфатазы. У девушек – мастеров спорта в наибольшей степени увеличены уровни ИМТ на фоне снижения уровней глюкозы, мочевины, альбумина,

ХС-ЛПВП, активности щелочной фосфатазы и повышения активности АлАТ, АсАТ и величины коэффициента «КФК/ЩФ». Таким образом, по мере преодоления возрастающих спортивных нормативов в раннем пубертатном возрасте к биохимическим показателям энергетического обеспечения спортивной деятельности добавляется снижение ОЖСС, имеющей отношение к менструальному циклу, а также показатели повреждения мембранных структур (АлАТ, АсАТ, КФК, ЩФ). У девушек-спортсменок позднего пубертатного периода возрастной группы 16–18 лет при достижении квалификации в диапазоне «взрослые разряды – мастер спорта» отмечено повышение активности АсАТ и величины коэффициентов «глюкоза/ОХС» и «глюкоза/ХС-ЛПНП». У кандидатов в мастера спорта и мастеров спорта выявлено повышение уровней общего билирубина, а у мастеров спорта обнаружено дополнительное снижение триглицеридов. В постпубертатном периоде (19–20 лет) установлено снижение значений ИМТ и повышение содержания общего билирубина по сравнению с контролем у кандидатов в мастера спорта и мастеров спорта. Приведенные материалы показывают, что основную опасность по развитию триады женщин-атлетов представляют занятия спортом в первом пубертатном периоде.

На третьем этапе исследования синдрома RED-S был произведен поиск диагностических биохимических показателей у подростков в зависимости от видов спорта [15]. Установлено, что для циклических видов спорта характерно снижение уровней глюкозы, ОЖСС и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для скоростно-силовых видов спорта – снижение количества альбумина, триглицеридов и ОЖСС; для спортивных единоборств – снижение ОЖСС и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для сложно-координационных видов спорта – снижение триглицеридов и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП».

Метаболический синдром

В работе использован оригинальный алгоритм выявления метаболического синдрома [16], включающий в себя следующие этапы:

1. Отбор обследуемых лиц с повышенными величинами индекса массы тела (ИМТ). Было предложено выделять 2 группы – первая с ИМТ 25,0–29,9 кг/м² (избыточная масса тела) и вторая с ИМТ ≥ 30 кг/м² (ожирение).
2. Отбор обследуемых лиц с уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – $< 0,9$ ммоль/л у мужчин и ХС-ЛПВП $< 1,2$ ммоль/л у женщин.
3. Отбор из оставшихся обследуемых лиц с гипергликемией (уровень глюкозы сыворотки $> 5,55$ ммоль/л).
4. Выделение пациентов с уровнем триацилглицеролов (ТГ) $> 1,8$ ммоль/л среди лиц с тремя элементами метаболического синдрома.
5. Отбор пациентов, у которых выставлен диагноз «артериальная гипертензия» (АГ). Установлено, что отбор спортсменов с факторами риска МС практически завершается после двух первых этапов: избыточная масса тела и уровень ХС-ЛПВП. Вспомогательную роль играют значения уровней глюкозы и триглицеридов.

При пересчете на 1000 обследуемых среди юношей-спортсменов можно выявить 17 человек с двумя факторами риска МС и 8 человек – с тремя факторами риска МС; среди девушек-спортсменок 18 человек имели два фактора риска МС и 4 человека – три фактора риска МС. Эти данные показывают, что показатель ХС-ЛПВП является



важнейшим для скрининга метаболического синдрома у спортсменов. Анализ данных состава тела с использованием технологии биоэлектрического импедансного анализа (аппарат BODY Analyzer 2040, Италия) показал возможный путь развития метаболического синдрома у спортсменов: увеличение массы тела за счет жировой составляющей; активация эндогенных антиоксидантов (в роли которых может выступать у девушек повышение содержания билирубина, а у юношей – мочевого кислоты); нарушение систем гомеостаза (у девушек – изменение транспорта железа, у юношей – недостаточность ХС-ЛПВП; нарушения функции состояния почек, печени, водно-солевого обмена; у женщин – нарушение функциональных показателей реактивности организма, у мужчин проявления проатеросклеротических изменений транспорта липидов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в статье материалы являются результатом наложения сложных биохимических процессов, вызванных различными спортивными нагрузками на биохимические процессы полового созревания подростков женского пола. Занятия спортом в подростковом периоде сопряжены с более частым выявлением гипотрофии, проявляющейся чаще у девушек в рамках комплекса симптомов «триады женщин-атлеток». По мере преодоления возрастающих спортивных нормативов в раннем пубертатном возрасте к биохимическим показателям энергетического обеспечения спортивной деятельности добавляется снижение ОЖСС, имеющей отношение к менструальному циклу, а также показатели повреждения мембранных структур (АлАТ, АсАТ, КФК, ЩФ). Установлено, что для циклических видов спорта характерно снижение уровней глюкозы, ОЖСС и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для скоростно-силовых видов спорта – снижение концентрации альбумина, триглицеридов и ОЖСС; для спортивных единоборств – снижение уровня ОЖСС и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП»; для сложно-координационных видов спорта – снижение уровня триглицеридов и коэффициента «глюкоза/ХС-ЛПНП». Уровень общего кальция сохраняется постоянным, что не позволяет использовать этот показатель в предсказании развития остеопороза. Возможно, использование метода определения ионизированного кальция может решить эту проблему.

Отбор спортсменов с факторами риска метаболического синдрома практически завершается после двух первых этапов оценки избыточной массы тела и уровня ХС-ЛПВП. Вспомогательную роль играет содержание глюкозы и триглицеридов.

Биохимические показатели риска развития синдрома относительного дефицита энергии чаще выявляются у спортсменок раннего пубертатного возраста, что может привести в будущем к патологическим компонентам «триады женщин-атлеток».

Раннее развитие метаболического синдрома в процессе полового созревания девушек-спортсменок может привести к клиническим проявлениям инсулинорезистентности и ее клиническим проявлениям.

Таким образом, своевременная оценка биохимических показателей, связанных с энергообеспечением организма, может обеспечить сохранение здоровья подростков женского пола и повысить эффективность их спортивных занятий.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Solntseva A.V., Sukalo A.V. (2010) *Premature sexual development in children: textbook. Method. allowance*. Minsk: BGMU, 31 p. (in Russian)
2. Brown K.A., Patel D.R., Darmawan D. (2017) Participation in sports in relation to adolescent growth and development. *Transl. Pediatr.* vol. 6, no 3, pp. 150–159.
3. Pogosyan T.A. (2018) Classification of age periods in athletes. *Scientific notes of the University named after P.F. Lesgaft*. № 6 (160). pp. 178–182. (in Russian)
4. Nattiv A., Loucks A.B., Manore M.M., Sanborn C.F. et al. (2007) The female athlete triad. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 39, no 10, pp. 1867–1882.
5. Javed A., Tebben P.J., Fischer P.R., Lteif A.N. (2013). Female Athlete Triad and Its Components: Toward Improved Screening and Management. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 88, no 9, pp. 996–1009.
6. Weiss Kelly A.K., Hecht S. (2016). The Female Athlete Triad. *Pediatrics*. vol. 138, no 2. e20160922. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0922>.
7. Melin A., Tornberg A.B., Skouby S., Muller S.S. et al. (2014) Energy availability and the female athlete triad in elite endurance athletes. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, vol. 25, no 5, pp. 61–622.
8. Bezuglov E.N., Lazarev A.M., Khaytin V.Yu. (2020) Effects of professional sports on menstrual function. reproduction problems. *Reproduction problems*, vol. 26, no 4, pp. 37–47. (in Russian)
9. Kuikman M.A., Mountjoy M., Stellingwerff T., Burr J.F. (2021) A Review of Nonpharmacological Strategies in the Treatment of Relative Energy Deficiency in Sport. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, vol. 31, no 3, pp. 268–275.
10. Stellingwerff T., Heikura I.A., Meeusen R. et al. (2021) Overtraining Syndrome (OTS) and Relative Energy Deficiency in Sport (RED-S): Shared Pathways, Symptoms and Complexities. *Sports Med*, vol. 51, pp. 2251–2280.
11. Castro-Pinero J., Laurson K.R., Artero E.G. (2019) Muscle strength-based tests to identify European adolescent at risk of metabolic syndrome: The HELENA study. *JSAMS (Journal of Science and Medicine in Sport)*, vol. 22, no 8, pp. 929–934.
12. Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A. (2019) Dependence of Health Biochemical Markers on Age and Gender during Sports in Puberty. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, vol. 8, no 3, pp. 420–429. (in Russian)
13. Adeli K., Higgins V., Nieuwesteeg M., Raizman J.E. et al. (2015) Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem*. vol. 61, no 8, pp. 1049–1062.
14. Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A. (2020) Dependence of Biochemical Health Markers on the Level of Sport Skills in Puberty. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, vol. 9, no 1–2, pp. 87–97. (in Russian)
15. Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A. (2020) Changes of Biochemical Health Markers in Olympic Sports Exercise during Puberty. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, vol. 9, no 3, pp. 302–313. (in Russian)
16. Chirkin A., Stepanova N., Chirkina A. (2017) Development of the metabolic syndrome in athletes. Metabolic syndrome: experiment, clinic, therapy: Proceedings of the III International Symposium, Grodno, Republic of Belarus, September 20–22, Grodno, "YurSaPrint", pp. 85–93. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.003>
УДК 616-097:577.213.32



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

Оценка состояния звеньев Т- и В-клеточного иммунитета на основе использования технологии определения эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TREC/KREC)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Полякова Е.А. – концепция и дизайн исследования; Стёганцева М.В. – обзор литературы, концепция создания калибраторов; Луцкович Д.В. – моделирование конструкции плазмидных стандартов; Белевцев М.В. – контроль выполнения исследования, редактирование.

Подана: 06.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: polyakovakat86@gmail.com

Резюме

Цель. Разработать эффективный молекулярно-биологический метод количественного определения кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора в периферической крови для диагностики нарушений состояния клеточного иммунитета.

Материалы и методы. Объектом исследования служили образцы периферической крови 20 здоровых детей в возрасте 9,0 (1,0–15,0) года и 30 детей с первичным и вторичным иммунодефицитом в возрасте 7,16 (0,1–18,0) года, контингент которых включал пациентов с диагнозами «первичный иммунодефицит» (n=21) и «вторичный иммунодефицит» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=9).

Результаты. Согласно полученным результатам, созданные калибраторы характеризовались высокой стабильностью и воспроизводимостью получаемых при их использовании результатов. В результате валидации разработанной технологии, в основе которой лежит полимеразная цепная реакция в реальном времени, установлено, что данная технология лабораторного исследования обладает высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью.

Заключение. Разработанная технология позволяет выявить различные виды нарушений с вовлечением иммунного механизма, которые сопровождаются дефицитом Т- и В-клеточного звена иммунитета.

Ключевые слова: TREC, KREC, полимеразная цепная реакция в реальном времени

Polyakova E.✉, Stegantseva M., Lutskovich D., Belevtsev M.
Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Evaluation of T- and B-cell Immunity Based on the T- and B-cell Receptor DNA Excision Circles (TREC/KREC) Detection Technology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Polyakova E. – concept and design of the study; Stegantseva M. – literature review, concept of calibrators design; Lutskovich D. – modeling the design of plasmid standards; Belevtsev M. – control of the study, editing.

Submitted: 06.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: polyakovakat86@gmail.com

Abstract

Purpose. Develop an effective molecular-biological method for quantitative determination of T- and B-cell receptor DNA circle fragments in peripheral blood to diagnose cellular immunity disorders.

Materials and methods. Subjects of the study were peripheral blood samples of 20 healthy children aged 9.0 (1.0–15.0) years and 30 children with primary and secondary immunodeficiency aged 7.16 (0.1–18.0) years, whose contingent included patients diagnosed with primary immunodeficiency (n=21) and secondary immunodeficiency after hematopoietic stem cell transplantation (n=9).

Results. According to the results obtained, the created calibrators were characterized by high stability and reproducibility of the results obtained when using them. As a result of the validation of the developed technology based on "real-time" polymerase chain reaction, it was found that this technology of laboratory examination has high sensitivity, specificity and efficiency.

Conclusion. The developed technology makes it possible to identify various types of disorders with involvement of the immune mechanism, which are accompanied by deficiency of T- and B-cell immunity.

Keywords: TREC, KREC, real-time polymerase chain reaction

■ ВВЕДЕНИЕ

Кольцевые фрагменты ДНК Т-клеточного рецептора (TREC) (с англ. T-cell receptor excision circles) и В-клеточного рецептора (KREC) (с англ. kappa-deleting recombination excision circles) представляют собой продукты рекомбинации, которые образуются на ранних этапах формирования Т- и В-клеточного рецепторов [1]. Поскольку TREC и KREC не способны к репликации и сохраняются после каждого клеточного деления в клетке, определение их количественного содержания в периферической крови может быть использовано для оценки состояния продукционной функции тимуса и костного мозга [2]. Определение TREC и KREC при неонатальном скрининге в Соединенных Штатах Америки (США) и европейских странах демонстрирует, что данный



способ выявления дефицита иммунитета при первичных иммунодефицитах (ПИД) является эффективной технологией и позволяет выявить детей на ранних стадиях заболевания [3–6]. Данный метод может быть также использован для оценки восстановления Т- и В-клеточного звена иммунитета у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [7–9]. В мире существует несколько разработанных тест-систем: одни из них позволяют определять только TREC, другие – как TREC, так и KREC одновременно [5, 10]. На территории Республики Беларусь данные наборы реагентов не зарегистрированы и использование их в настоящее время не представляется возможным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать эффективный молекулярно-биологический метод количественного определения кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора в периферической крови для диагностики нарушений состояния клеточного иммунитета.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы периферической крови 20 здоровых детей в возрасте 9,0 (1,0–15,0) года и 30 детей с первичным и вторичным иммунодефицитом в возрасте 7,16 (0,1–18,0) года, контингент которых включал пациентов с диагнозами «первичный иммунодефицит» (n=21) и «вторичный иммунодефицит» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=9).

Для полимеразной цепной реакции были использованы праймеры и зонды: прямой праймер ALB (5'-tgaacaggcgaccatgctt-3'), обратный праймер (5'-ctctcctctcagaagtggtgcatat-3'), проба (5'-FAM-tgctgaaacattcaccttccatgcaga-BHQ1-3'), для TREC – прямой праймер (5'-ccatgctgacacctctggtt-3'), обратный праймер (cttcattcacctgtctcacga), проба (HEX-cacggtgatgataggcacctgc-BHQ1-3'), для KREC – прямой праймер (5'-tcagcgcaccattacgtttct-3'), обратный праймер (5'-gtgagggacascgagcc-3'), проба (5'-ROX-ccagctctaccctagagtttctgcacgg-BHQ2-3') (Праймтех, Беларусь) [11–13].

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР-РВ с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

В качестве калибраторов использовались серийные разведения плазмидной ДНК, содержащие вставки TREC, KREC, альбумин с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Количество копий TREC, KREC на 1 млн клеток рассчитывалось по формуле: $[1\ 000\ 000 \times \text{среднее SQ TREC (KREC)} / \text{среднее SQ ALB} / 2]$.

Реакционная смесь состояла из 12,5 мкл ArtMix (АртБиоТех, Беларусь), 6,25 мкл воды и стока праймеров с концентрацией 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для флуоресцентной пробы. Постановка осуществлялась в дублях. Данные анализировались в режиме Real_time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Рестрикция. ПЦР-продукты и плазмиду pCR2.1-ТОПО подвергали рестрикции эндонуклеазами (New England Biolabs, Великобритания), необходимыми для клонирования согласно инструкции производителя. По окончании реакции проводили гель-электрофорез в 2%-м агарозном геле, фрагменты соответствующего размера вырезали, очищали и измеряли концентрацию продуктов рестрикции и плазмиды.

Лигирование. Лигирование ПЦР-продуктов в вектор проводили с использованием набора реагентов для лигазной реакции (Thermo Fisher, США) согласно прилагаемой к набору инструкции. Соотношение концентраций вставки к вектору определяли с помощью программы «Ligation Calculator» (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

Реакция трансформации компетентных клеток *E. coli*. В качестве компетентных клеток использовали штамм XL10Gold бактерии *E. coli*. После успешной трансформации выделяли плазмидную ДНК набором PureLink HiPure Plasmid miniprep (Invitrogen, США). Выделенную плазмиду секвенировали для определения наличия встроенного фрагмента.

Секвенирование и проверка их аутентичности. Для реакции терминации использовали, набор реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США), согласно инструкции производителя.

Очистка продуктов реакции терминации от несвязавшихся флуоресцентно-меченных дидезоксинуклеотидов проводили путем преципитации ДНК с 0,125М ЭДТА и 96%-м этиловым спиртом. Секвенирование выполняли с использованием аппарата для капиллярного секвенирования (Applied Biosystems 3130).

Для анализа использовали программы Sequencing Analysis 5.2 и Bioedit. Референсные последовательности находятся в онлайн базе Ensembl.org.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве гена внутреннего контроля был выбран ген альбумин, специфичный для гемопоэтической ткани. Праймеры для TREC были подобраны на участок линейного соединения генов дельта-цепи, ограниченного делетирующими последовательностями. Праймеры на KREC подбирали на делетирующий фрагмент IGH (табл. 1).

Прямой и обратный праймеры были использованы для амплификации и последующего клонирования. Пары праймеров с флуоресцентной меткой были использованы для мультиплексной ПЦР в реальном времени.

Количественная ПЦР основана на использовании калибраторов. В качестве калибраторов были разработаны и получены плазмидные стандарты на основе вектора pCR2.1-TOPO Vector (Invitrogen, США). В выбранный вектор были клонированы амплифицированные фрагменты контрольного гена, TREC и KREC. Для проектирования, моделирования и визуализации процесса клонирования использовали программное обеспечение SnapGene Software.

Процесс клонирования состоял из последовательных этапов.

Проводили амплификацию последовательности альбумина, TREC и KREC с использованием геномной ДНК, полученной от здорового донора и специфичных праймеров.

Праймеры для альбумина содержали на 5' конце последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз Not1 и XhoI (Праймтех, Беларусь), для KREC – сайты рестрикции HindIII для обоих праймеров с соответствующим количеством фланкирующих нуклеотидов (табл. 3). Для TREC были использованы пары праймеров, не содержащие в своей последовательности рестрикционных сайтов по причине того, что за счет топоизомеразы I pCR2.1-TOPO вектора встраивание происходит по акцепторным ТА-концам вектора.



ПЦР-амплификацию проводили в объеме 25 мкл и включающем: 5 мкл 5-кратного буфера, 0,2 мкл 25 мМ ДНТФ, 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,15 мкл 5Ед термостабильной полимеразы, по 10 пмоль мкл прямого и обратного праймеров 15,9 мкл воды. Для амплификации использовали следующие температурные условия: 95 °С – 10 мин., 35 циклов (95 °С – 15 сек., отжиг 60 °С – 20 сек.), 72 °С – 30 сек., 72°С – 5 мин., 4 °С – 2 мин.

Эффективность ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле при напряжении 150 В и силе тока 150 мА – 40 мин. в аппарате для горизонтального электрофореза. Визуализацию результата электрофореза проводили с использованием системы гель-документирования и программного обеспечения. Далее проводили очистку полученного ПЦР-продукта соответствующего размера с использованием набора реагентов для очистки ПЦР продукта из геля (АртБиоТех).

Вначале проводили клонирование последовательности TREC в вектор, для этого очищенный ПЦР-продукт лигировали в плазмидный вектор pCR2.1-TOPO Vector. Трансформировали лигазной смесью клетки XL10Gold бактерии *E. coli*. Отбирали позитивные трансформанты, культивировали, выделяли плазмидную ДНК. Выделенную плазмиду секвенировали для определения наличия встроенного фрагмента.

Следующий этап – клонирование последовательности KREC. Для этого очищенный ПЦР-продукт KREC и полученную плазмиду pCR2.1-TOPO, содержащую вставку TREC, подвергали рестрикции эндонуклеазой HindIII (New England Biolabs, Великобритания) согласно инструкции производителя. Продукты рестрикции также подвергали гель-электрофорезу, фрагменты вырезали, очищали и измеряли концентрацию продуктов рестрикции KREC. Лигировали фрагмент KREC в вектор, проводили трансформацию, выделение плазмиды из культивированной среды и секвенирование для определения наличия встроенного фрагмента.

Клонирование последовательности контрольного гена проводилось после этапов успешного встраивания TREC и KREC в вектор. Очищенный ПЦР-продукт альбумина и плазмиду pCR2.1-TOPO, содержащую последовательность TREC vs KREC, подвергали рестрикции NotI и XhoI (New England Biolabs, Великобритания) согласно инструкции производителя. После гель-электрофореза продукты рестрикции очищали, измеряли концентрацию продукта рестрикции ALB и плазмиды, лигировали, трансформировали в клетки *E. coli*, выделяли плазмиду из культивированной среды и секвенировали.

По результатам клонирования была получена плаزمида, несущая 3 вставки: ALB – TREC – KREC, как представлено на рис. 1 [13].

Линеаризировали плазмиду посредством рестрикции эндонуклеазой Xba I. Измеряли концентрацию при помощи Calculator for determining the number of copies of a template (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Для построения калибровочной кривой использовали серийные разведения с шагом в 10 раз плазмидной ДНК до получения концентраций 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ копий в 5 мкл. Оценивали полученные разведения при помощи калибровочных кривых после проведения ПЦР-РВ, данные представлены в табл. 1.

Для оценки воспроизводимости метода была проведена серия ПЦР-реакций с одним образцом ДНК в 10 повторах внутри серии, в одном запуске, в 10 последовательных запусках.

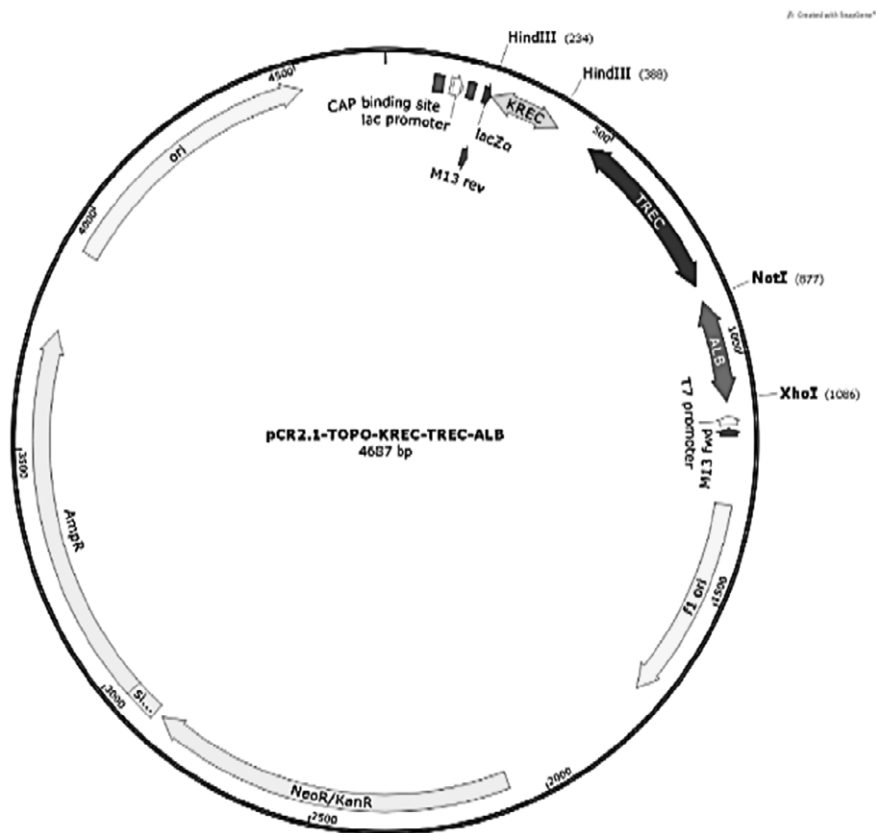


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды, содержащая ALB – TREC – KREC в векторе pCR2.1-TOPO
 Fig. 1. Genetic map of the plasmid containing ALB – TREC – KREC in the pCR2.1-TOPO vector

Таблица 1
 Проверка стандартных разведений плазмидной ДНК ALB – TREC – KREC с использованием ПЦР-РВ
 Table 1
 Verification of standard dilutions of plasmid DNA ALB – TREC – KREC using PCR-RQ

| Количество | Среднее значение ± (SD) Ct ALB | Среднее значение ± (SD) Ct TREC | Среднее значение ± (SD) Ct KREC |
|--|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 10 ⁵ | 21,42±0,12 | 22,06±0,09 | 22,11±0,10 |
| 10 ⁴ | 24,76±0,19 | 25,01±0,12 | 25,14±0,26 |
| 10 ³ | 27,71±0,21 | 28,04±0,10 | 28,21±0,19 |
| 10 ² | 30,82±0,17 | 31,12±0,24 | 31,29±0,22 |
| 10 ¹ | 33,78±0,14 | 34,02±0,16 | 34,06±0,18 |
| Наклон | 3,337 | 3,335 | 3,323 |
| Коэффициент корреляции, R ² | 0,989 | 0,990 | 0,991 |
| Эффективность, % | 98,0 | 99,5 | 99,9 |

Таблица 2
Результаты оценки воспроизводимости метода мультиплексного варианта ПЦР-РВ
Table 2
Results of the reproducibility assessment of the multiplex PCR-RQ

| | | ALB | | TREC | | KREC | |
|--------------------------|--------------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|
| | | Ct | Число копий | Ct | Число копий | Ct | Число копий |
| Внутрисерийная (n=10) | Среднее значение | 22,3 | 7,9×10 ⁴ | 30,0 | 1,9×10 ² | 30,1 | 2,3×10 ² |
| | Коэффициент вариации (%) | 1,5 | 2,5 | 1,2 | 9,5 | 1,1 | 11,9 |
| Межсерийная (n=10) | Среднее значение | 21,6 | 8,0×10 ⁴ | 30,3 | 1,7×10 ² | 31,3 | 7,4×10 ¹ |
| | Коэффициент вариации (%) | 1,3 | 9,8 | 0,5 | 7,6 | 2,4 | 17,7 |

Для оценки точности и повторяемости результатов для стандартных разведений контрольного гена альбумина, TREC и KREC, а также для количественных показателей, полученных внутри серии и между сериями ПЦР-РВ, были рассчитаны показатели коэффициента вариации: отношения стандартного отклонения к среднему значению. Полученные данные представлены в табл. 2.

Коэффициент вариации равен отношению стандартного отклонения к среднему значению.

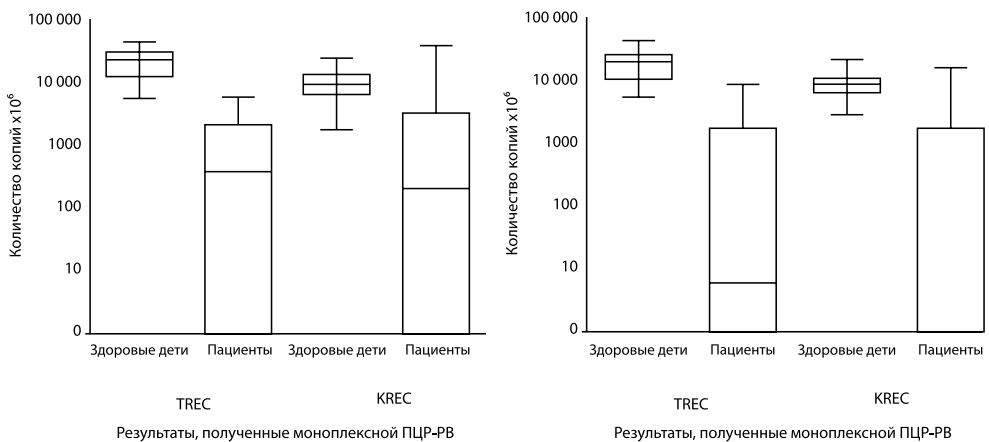


Рис. 2. Результаты значений TREC и KREC, полученные методом моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ по результатам валидации
Fig. 2. Results of TREC and KREC values obtained by monoplex and multiplex PCR-PV validation

При оценке ΔCt ALB, TREC, KREC наблюдалась средняя вариация данных, которая не превышала 20%. Таким образом, мультиплексная ПЦР-РВ для определения количества копий TREC и KREC позволяет использовать данный метод в лабораторной практике.

Проведено экспериментальное доказательство того, что данная технология может быть использована для определения дефицита иммунитета.

Для валидации разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ в качестве референсного метода для оценки сопоставимости результатов использовали метод моноплексной ПЦР-РВ [11].

Были определены значения TREC и KREC у пациентов с первичными (n=21) и вторичными (n=9) иммунодефицитами, а также у здоровых лиц детского возраста (n=20). Результаты отражены на рис. 2.

Для сравнения данных, полученных с применением референсного метода и мультиплексной ПЦР, использовали метод линейной регрессии. Для TREC коэффициент детерминации (R^2) составил 0,92 ($p < 0,001$), для KREC – 0,83 ($p < 0,001$).

При определении значимости статистических различий при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни не было выявлено значимых различий между референсным методом и разработанной технологией TREC ($U=1122$, $p=0,57$), KREC ($U=1065$, $p=0,33$).

С целью оценки диагностической значимости разработанной технологии были рассчитаны показатели диагностической чувствительности, диагностической специфичности, диагностической эффективности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результата. Полученные данные отражены в табл. 3 [14, 15].

Для установления с использованием данной технологии точки разделения был осуществлен ROC-анализ с построением кривой, которая отражает взаимную зависимость вероятностей ложноположительных и истинно положительных результатов. Данные отражены на рис. 3.

Таблица 3
Оценка диагностической ценности технологии определения TREC/KREC
Table 3
Assessment of Diagnostic Value of TREC/KREC Technology

| Критерий | Формула для расчета | Значение TREC | Значение KREC |
|--|---|---------------|---------------|
| Диагностическая чувствительность, % | $a/(a+c)$ = доля истинно положительных результатов в группе пациентов | 93,9 | 91,4 |
| Диагностическая эффективность, % | $(a+d)/(a+b+c+d)$ = доля истинных результатов среди всех результатов теста | 96,0 | 94,0 |
| Диагностическая специфичность, % | $d/(b+d)$ = доля истинно отрицательных результатов в группе здоровых | 100,00 | 100,00 |
| Предсказательная ценность положительного результата, % | $a/(a+b)$ = доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов | 100,00 | 100,00 |
| Предсказательная ценность отрицательного результата, % | $d/(c+d)$ = доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных результатов | 89,4 | 83,3 |

Примечания: a – истинно положительный результат, b – ложноположительный результат, c – ложноотрицательный результат, d – истинно отрицательный результат.

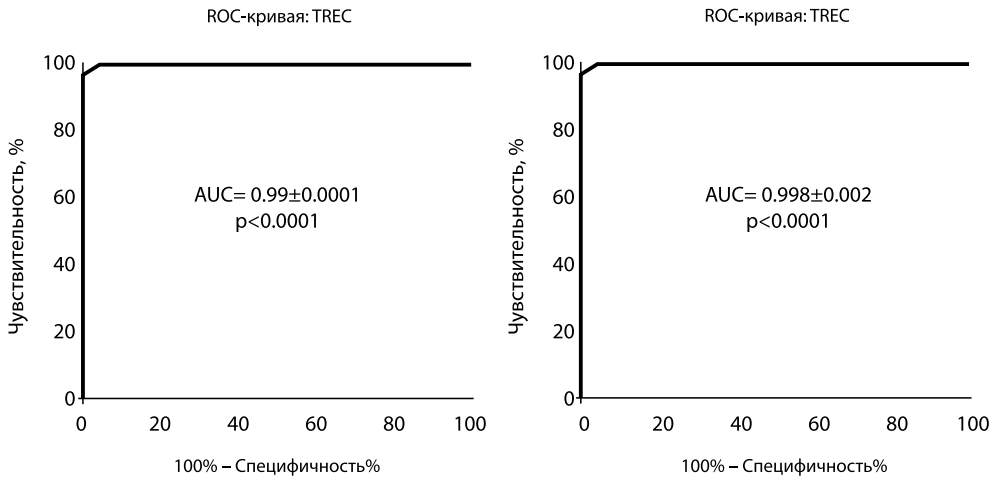


Рис. 3. Результат построения ROC-кривой для оценки чувствительности и специфичности для TREC и KREC, определенных методом мультиплексной ПЦР-РВ
Fig. 3. Result of ROC curve for sensitivity and specificity assessment for TREC and KREC determined by multiplex PCR-RQ method

Для TREC площадь под ROC-кривой составила $0,99\pm 0,0001$ (с диагностической чувствительностью и специфичностью 93,3% и 100% соответственно). Для KREC площадь под ROC-кривой составила $0,9998\pm 0,002$ (с диагностической чувствительностью и специфичностью 91,4% и 100% соответственно).

Для возможности практического использования тест-систем, методов и технологий в лабораторной диагностике оптимальным является соотношение показателей высокой диагностической чувствительности (80% и более) и высокой диагностической специфичности (80% и более) [14].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная технология определения значений TREC и KREC методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью и может быть использована в клинической лабораторной практике для выявления недостаточности функционального состояния Т- и В-клеточного звеньев иммунитета.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J.M. PID comes full circle: Applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*. 2011; 2:1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00012>.
2. Van Zelm M.C., Szczepański T., Van Der Burg M., Van Dongen J.J.M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(3):645–655. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>.
3. Puck J.M. Laboratory Technology for Population-based Screening for SCID in Neonates: The Winner Is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;3:607–616.

- Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):391–398. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.012>
- Borte S., Von Döbeln U., Fauth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2012; 119(11):2552–2555. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371021>
- Nakagawa N., Imai K., Kanegane H., Sato H., Yamada M., Kondoh K., Okada S., Kobayashi M., Agematsu K., Takada H., Mitsui N., Oshima K., Ohara O., Suri D., Rawat A., Singh S., Pan-Hammarström Q., Hammarström L., Reichenbach J., Nonoyama S. Quantification of κ-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(1):223–225.e2. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.052>
- Sottini A., Ghidini C., Zanotti C. et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology*. 2012;136:217–227.
- Sairafi D., Mattsson J., Uhlin M., Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clinical Immunology*. 2012;142(3):343–350.
- Polyakova E., Stegantseva M., Belevtsev M. Monitoring of post-transplant naïve lymphocytes reconstitution in PID patients using TREC and KREC quantification. Virtual annual meeting: immune deficiency and dysregulation North American conference: selected abstr. from the 12th annual meeting of the Clin. Immunol. Soc. *J. of Clin. Immunol.* 2021;1(41):111. Abstr. 182.
- Neonatal E., Kit T. iMedPub Journals MyTREC RealTime qPCR Assay Reagent Kit for Quantification of Human T-Cell Receptor Excision Circles (TRECs) Applications of TREC Assay Kit Contents GenenPlus MyTREC Kit versus Perkin. 2015;2–5. Available at: <https://doi.org/10.21767/2472-1158.100004>
- Polyakova E.A., Stegantseva M.V., Guryanova I.E., Sakovich I.S., Belevtsev M.V. (2019) T- and B-cell receptor ring molecules (TREC/KREC) in differential diagnosis of primary immunodeficiencies. *Science and innovation*. 2019;8:75–78. (in Russian)
- Stegantseva M.V., Guryanova I.E., Sakovich I.S., Polyakova E.A., Belevtsev M.V. Method for quantitative determination of ring molecules of T- and B-cell receptor DNA, TREC and KREC, in peripheral blood using real-time PCR. *Eurasian Journal of Oncology*. 2017;3:449–456. (in Russian)
- Polyakova E.A., Stegantseva M.V., Aleshkevich S.N. et al. Determination of excision circles of T- and B-cell receptor DNA by multiplex real-time PCR: instructions for use. 2020; Minsk, 24 p. (In Russian). Available at: <https://medcenter.by/documents-downloads/publicacii/neonatologiapediatria/instrukcija-po-primeneniju-036-0520.pdf>.
- Kostyuk S.A. Validation of molecular biological methods of laboratory diagnosis. *Med. nov.*, 2012;4:16–19. (in Russian)
- Kishkun A.A. Guide to laboratory methods of diagnosis for doctors and paramedics providing primary care. 2007; Moscow: GEOTAR-Media; [B.m.]: ASMOC, 800 p. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.004>
УДК 616.155.392-036.11-036.87-097.3-071:577.27.088.7



Луцкович Д.В.✉¹, Столярова Е.А.², Полякова Е.А.¹, Мелешко А.Н.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем имени Сергея Березина, Санкт-Петербург, Россия

Значимость идентификации реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Луцкович Д.В. – концепция и дизайн исследования; Столярова Е.А. – редактирование; Полякова Е.А. – обзор литературы; Мелешко А.Н. – контроль выполнения исследования.

Подана: 06.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: lutskovichdm@gmail.com

Резюме

Цель. Определить разнообразие и частоту встречаемости возникающих при В-линейном остром лимфобластном лейкозе реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора и использовать выявление этих мишеней в качестве тестов диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни.

Материалы и методы. В исследование был включен 81 пациент в возрасте от 1 года до 18 лет (медиана возраста 9,5 года) с диагнозами «В-линейный острый лимфобластный лейкоз» и «рецидив острого лимфобластного лейкоза», получающий лечение по протоколу ALL MB-2008 и ALL-REZ BFM 2002 соответственно. Из них мониторинг минимальной остаточной болезни был произведен для 69 пациентов, с первичным ОЛЛ – 28 пациентов, с рецидивом ОЛЛ – 41 пациент.

Результаты. Согласно полученным данным, одна клональная реаранжировка была обнаружена у 88,8% (72/81) пациентов с В-линейным ОЛЛ, две и более – у 24,79% (20/81) пациентов. Наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты VH-JH (44,9% от всех выявленных реаранжировок) и на реаранжировки гена TCRG Vγ1 – Jγ (20,41% от всех выявленных реаранжировок). У всех пациентов с острым лимфобластным лейкозом наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии. У 3 (7,31%) пациентов с рецидивом острого лимфобластного лейкоза наблюдался рост МОБ. У 22 (53,65%) определялась молекулярная ремиссия на этапе терапии, у 12 (29,26%) пациентов наблюдалось снижение показателей МОБ до уровня предела чувствительности метода 10⁻⁵, 4 (9,75%) пациента находятся на стадии наблюдения.

Выводы. Мониторинг минимальной остаточной болезни с высокой чувствительностью («молекулярная ремиссия») имеет большое прогностическое значение для пациентов с ОЛЛ, особенно группы высокого риска, при лечении рецидива или после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В настоящей статье приведены результаты по разнообразию и частотам выявления при ОЛЛ мишеней МОБ и их практическое использование в диагностике. Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях ОЛЛ и в 95,8% пригодны для ПЦР-мониторинга МОБ. ПЦР в реальном времени позволяет количественно измерять низкие уровни МОБ с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах терапии.

Ключевые слова: реаранжировки, минимальная остаточная болезнь, острый лимфобластный лейкоз, аллель-специфические олигонуклеотиды, иммуноглобулин, Т-клеточный рецептор

Lutskovich D.✉¹, Stolyarova E.², Polyakova E.¹, Meleshko A.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² Diagnostic and Treatment Center of the International Institution for Biological Systems named after Sergey Berezin, Saint Petersburg, Russia

Significance of Identification of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements for the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in B-Linear Acute Lymphoblastic Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Lutskovich D. – concept and design of the study; Stolyarova E. – editing; Polyakova E. – literature review; Meleshko A. – control of the study.

Submitted: 06.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: lutskovichdm@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the diversity and frequency of occurrence of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements that occur in B-linear acute lymphoblastic leukemia and use the identification of these "targets" as diagnostic tests and monitoring of minimal residual disease.

Materials and methods. The study included 81 patients aged 1 to 18 years (median age 9.5 years), diagnosed with "B-linear acute lymphoblastic leukemia" and "recurrent acute lymphoblastic leukemia", receiving treatment according to the ALL MB-2008 protocol and ALL-REZ BFM 2002 respectively. Of these, monitoring of minimal residual disease was performed for 69 patients, with primary ALL – 28 patients, with recurrent ALL – 41 patients.

Results. According to the results obtained, at least one clonal rearrangement was found in 88.8% (72/81) of patients with B-linear ALL, two or more in 24.79% (20/81) of patients.



The highest frequency of occurrence of rearrangements falls on the VH-JH gene segments (44.9% of all identified rearrangements) and V λ I-J λ rearrangements (20.41% of all identified rearrangements). In all patients with acute lymphoblastic leukemia, a decrease in MRD values was observed at the stage of therapy. In patients with relapse of acute lymphoblastic leukemia, 3 (7.31%) patients showed an increase in MRD. In 22 (53.65%) patients, molecular remission was determined at the stage of therapy, in 12 (29.26%) patients, a decrease in MRD values was observed to the level of the sensitivity limit of the method 10^{-5} , 4 (9.75%) patients are under observation.

Conclusions. Monitoring of minimal residual disease with high sensitivity ("molecular remission") is of great prognostic value for patients with ALL, especially at high risk, in the treatment of relapse or after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This article presents the results on the diversity and frequency of MRD targets detected in ALL, and their practical use in diagnostics. Rearrangements of Ig/TCR genes occur in almost all cases of ALL, and in 95.8% are suitable for PCR monitoring of MRD. Real-time PCR allows quantitative measurement of low MRD levels with a sensitivity up to, which allows the use of clinically relevant threshold levels of MRD in treatment protocols at different stages of treatment.

Keywords. Rearrangements, minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, allele-specific oligonucleotides, immunoglobulin, T-cell receptors

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – онкологическое заболевание, наиболее часто встречающееся в детском возрасте, развивается стремительно и имеет высокую летальность. К настоящему времени лечение данного заболевания имеет достаточно высокую эффективность и дальнейшую продолжительную ремиссию. Однако всегда остается вероятность развития рецидива, что является основной и достаточно частой проблемой. Рецидивы возникают у 30–35% пациентов и являются одной из наиболее частых причин смертности [1, 2]. Выживаемость пациентов, у которых возник рецидив, составляет около 3–19% (в группе высокого риска) [3]. В случае клинического рецидива после проведенной терапии согласно протоколу лечения варианты дальнейшего лечения ограничены и часто неэффективны. В то же время терапия на стадии раннего рецидива (до гематологического проявления), когда клон лейкоза еще невелик, более эффективна, чем лечение рецидива перенесенного заболевания. Поэтому особенно важно вести мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) для предсказания раннего рецидива.

На сегодняшний день существует несколько принципиально различных методов выявления минимальной остаточной болезни: проточная цитометрия и количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием в качестве мишеней химерных онкогенов или клональных реаранжировок генов иммуноглобулина (Ig) или Т-клеточного рецептора (TCR) [4–6]. Метод ПЦР-РВ является наиболее чувствительным, но остается актуальным выбор мишени и интерпретация результатов. Химерные онкогены обладают достаточной специфичностью, но выявляются не более чем в 30% случаев детского острого лимфобластного лейкоза [7–9].

Реаранжировка генов Ig и TCR – это нормальный физиологический процесс, который проходит на ранних стадиях дифференцировки лимфоцитов в костном мозге и тимусе. Лимфоциты в нормальном состоянии имеют практически неограниченное количество вариантов реаранжировки, что является большим потенциалом для антигенного распознавания адаптивного иммунитета. Все огромное разнообразие специфических Ig и TCR молекул является результатом соматической реаранжировки ограниченного набора «зародышевых» последовательностей.

V(D)J-реаранжировка представляет собой ряд последовательных реакций сближения, разрывов и воссоединений двойной спирали ДНК и протекает в два этапа. На первом этапе рекомбиназы – продукты гена RAG1 и RAG2 (recombination activation genes) – распознают RSS (recombination signal sequence) и связываются с ними. Рекомбиназы вносят односторонний разрыв в ДНК на 5' конце гептамера и активируют 3'-ОН конец кодирующего сегмента, который гидролизует фосфатную связь во второй нити ДНК с образованием ковалентно замкнутой шпильки на конце сегмента и тупых концов гептамера. На втором этапе реакции тупые концы гептамеров соединяются, образуя так называемое сигнальное соединение. Кодирующие концы перед объединением подвергаются процессингу. Шпилька расщепляется в случайном месте, оставляя иногда палиндромную последовательность, называемую Р-нуклеотидами, на конце генного сегмента. Перед воссоединением генных сегментов концы ДНК могут немного деградировать при участии экзонуклеаз, а также происходит нематричное добавление так называемых N-нуклеотидов терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT). В итоге кодирующие концы объединяются. Результатом реаранжировки генов антигенных рецепторов является сближение отдельных генных сегментов в процессе генетической рекомбинации. При неточном воссоединении и добавлении нематричных нуклеотидов перестроенный ген составляет уникальную для данной клетки (клона) последовательность, детерминирующую уникальную антиген-распознающую специфичность рецептора [10].

Перечень праймеров для первичного скрининга реаранжировок Ig/TCR, рекомендации по интерпретации количественных данных, рекомендации по оценке МОБ методом ПЦР-РВ были высоко стандартизированы благодаря международному сотрудничеству с Европейской исследовательской группой по выявлению МОБ при ОЛЛ [11, 12].

Использование метода минимальной остаточной болезни для детей с острым лимфобластным лейкозом позволяет составить прогноз эффективности предпринимаемого лечения, предсказания рецидива и принять решение о проведении трансплантации ГСК.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить разнообразие и частоту выявляемых реаранжировок генов иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора у пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом и на основании полученных данных предложить новую методологию диагностики минимальной остаточной болезни.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2011 по 2022 г. обследован 81 пациент в возрасте от 1 года до 18 лет (медиана возраста 9,5 года) с диагнозами «острый лимфобластный лейкоз»



и «рецидив острого лимфобластного лейкоза», получавший лечение по протоколам ALL MB-2008 и ALL-REZ BFM 2002. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь.

В качестве биологического материала для исследования использовали геномную ДНК, выделенную из мононуклеаров пунктата костного мозга (КМ) с содержанием опухолевых клеток более 90%.

Для последовательной амплификации переменных регионов тяжелой/легких цепей иммуноглобулина и T-клеточного рецептора использовали метод ПЦР. Реакционная смесь состояла из 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,2 ммоль/л дНТП и содержала 12,5 пмоль каждого из праймеров, 0,5 U Taq-полимеразы и 100 нг ДНК в объеме раствора 30 мкл.

Гетеродуплексный анализ для различения моноклональных и поликлональных продуктов ПЦР, полученных из клональных лейкоэмических клеток и поликлональных реактивных лимфоцитов соответственно, проводили по протоколу – денатурация (95 °С, 5 мин.) и ренатурация (4 °С, 1 ч.) для образования дуплекса. Обнаружение гомодуплексов (ренатурация идентичных одиночных цепей ДНК) указывало на моноклональность. Обнаружение гетеродуплексов (ренатурация цепей ДНК частично отличающейся последовательности, соответствующей стыку между перестроенными генами) интерпретировалось в соответствии с характером миграции как биклональная/биаллельная перестройка.

Для секвенирования моноклональных продуктов ПЦР использовали праймеры для амплификации в обоих направлениях. Идентификацию реаранжированных генов проводили путем сравнения полученных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными в базах данных IMGT® (<http://imgt.cines.fr>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Аллель-специфические олигонуклеотиды подбирали к соединительному региону перестроенных генов Ig/TCR, то есть на стыке V- (D) J-геновых сегментов, максимально располагая праймер в области нематричных (N) нуклеотидов. Праймер подбирался в прямой ориентации относительно V(D)J региона и в обратной, в зависимости от типа реаранжировки и комбинации со вторым (консенсусным) праймером и зондом [12, 13].

Для амплификации использовали двухкратную реакционную смесь, не содержащую референсных красителей, воду и раствор смеси праймеров. Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, включающем в себя 10 пмоль каждого праймера, 5 пмоль TaqMan пробы и 500 нг геномной ДНК.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение и идентификация реаранжировок генов Ig/TCR

В результате проведенных исследований было выявлено 95 клональных реаранжировок генов Ig/TCR для 72 пациентов (для 9 пациентов из 81 реаранжировки обнаружены не были), включающих 46 реаранжировок гена IgH, 15 реаранжировок гена IgK (10 V_k-K_{de} и 5 V_k-J_k), 16 неполных перегруппировок TCRD (11 V_δ2-D_δ3 и 5 D_δ2-D_δ3), 18 реаранжировок TCRG (6 – V_γI – J_γ1.1/2.1, 9 – V_γI – J_γ1.3/2.3, 2 – V_γII – J_γ1.3/2.3, 5 – V_γIII – J_γ1.3/2) и 4 перегруппировки TCRB (2 V_β: J_β и 2 D_β-J_β).

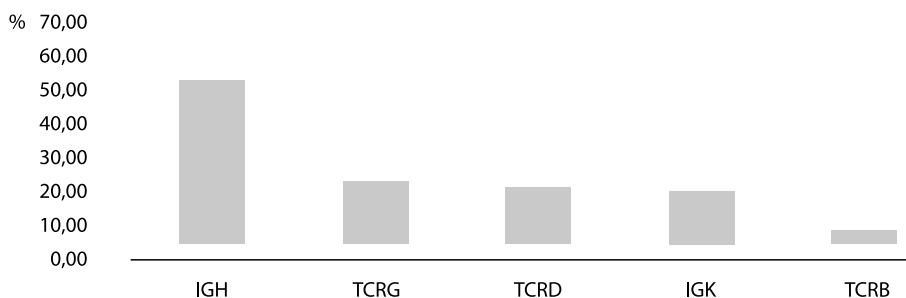


Рис. 1. Процентная частота встречаемости по генным сегментам
Fig. 1. Percentage frequency of occurrence by gene segments

В результате хотя бы одна клональная реаранжировка была обнаружена у 88,8% (72/81) пациентов с В-клеточным ОЛЛ, а также две и более у 24,79% (20/81) пациентов. Характерным является то, что наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты VH-JH (44,9% от всех выявленных реаранжировок) и V μ I – J μ (20,41% от всех выявленных реаранжировок). Данные по процентному соотношению обнаруженных реаранжировок генов Ig/TCR представлены на рис. 1.

Кроме того, были изучены частота варибельных генов, генов разнообразия и соединения в реаранжировках, идентифицированных в отдельных локусах Ig/TCR, для определения характера использования V(D)J.

Реаранжировки в локусе IgH чаще всего затрагивали члены семейства VH3-JH (47,83%, 22/46) VH1-JH (17,39%, 8/46), VH6-JH (15,22%, 7/46) и VH4-JH (13,04%, 6/46). Из реаранжировок в локусе IgK наиболее часто выявлялись члены семейства V κ 1-KDE (66,67%, 10/15) и V κ -J κ (33,33%, 5/15). В локусе TCRD перестройки V δ 2-D δ 3

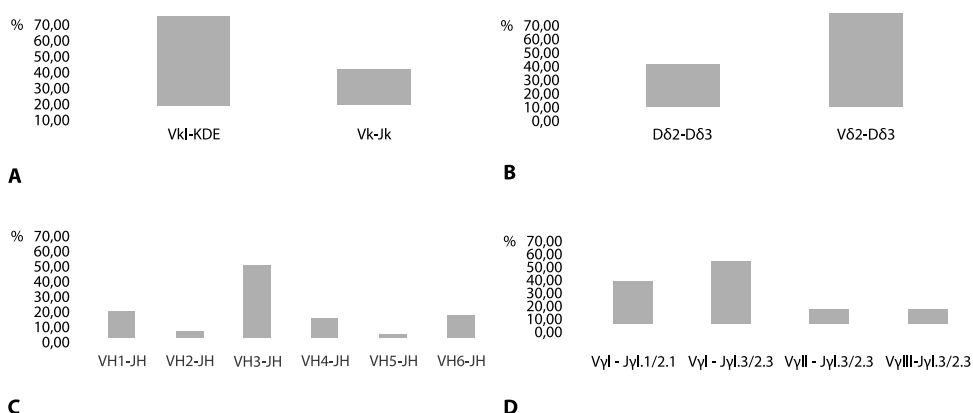


Рис. 2. Процентная частота встречаемости реаранжировок в локусах А – IgK, В – TCRD, С – IgH, D – TCRG
Fig. 2. Percentage frequency of occurrence of rearrangements in loci A – IgK, B – TCRD, C – IgH, D – TCRG

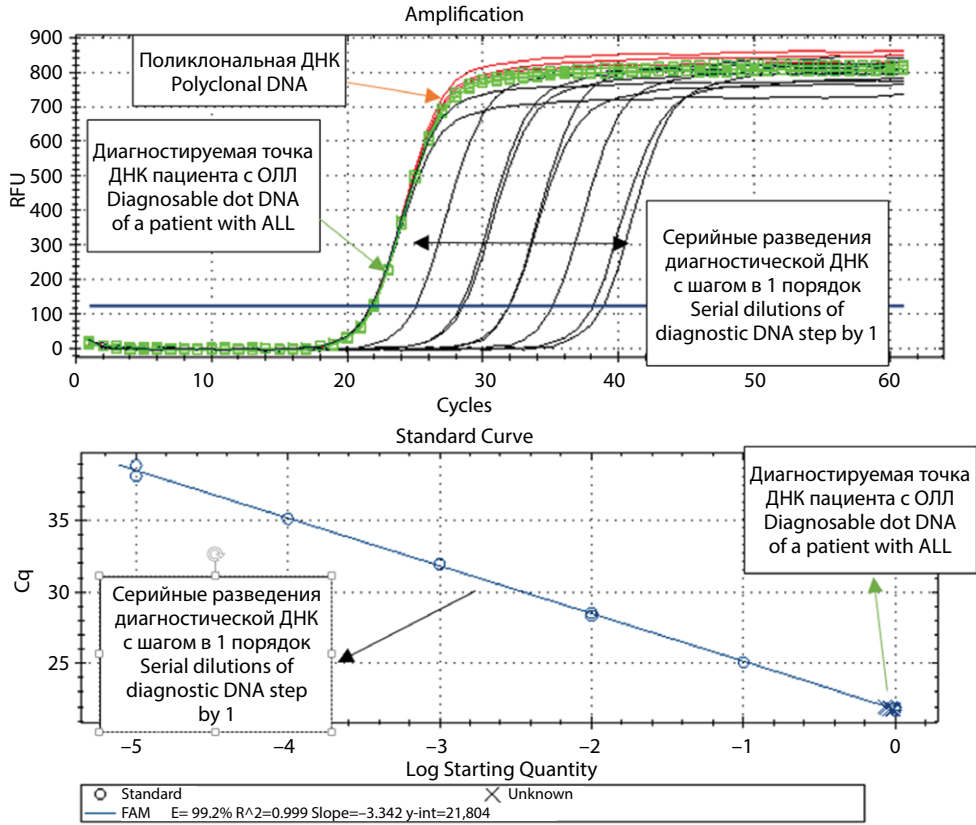


Рис. 3. Выполнение калибровки и построение стандартной калибровочной кривой для одного пациента с ОЛЛ при анализе МОБ для контрольного гена (альбумин)

Примечания: зеленая амплификационная кривая – диагностируемая точка ДНК пациента с ОЛЛ на этапе лечения; красная амплификационная кривая – поликлональная ДНК; синие амплификационные кривые – серийные разведения диагностической ДНК с шагом в 1 порядок; Slope – угловой коэффициент; R – коэффициент корреляции; E – эффективность ПЦР.

Fig. 3. Performing calibration and building a standard calibration curve, for one patient with ALL, in the analysis of MRD for the control gene (albumin)

Notes: green amplification curve – diagnosed point of the patient's ALL DNA during treatment; red amplification curve – polyclonal DNA; blue amplification curves – serial dilutions of diagnostic DNA with a step of 1 order; Slope – slope; R – correlation coefficient; E – PCR Efficiency.

(68,75%, 11/16) были преимущественно идентифицированы по сравнению с Dδ2-Dδ3 (31,25%, 5/15). В локусе TCRG в реаранжировках наиболее часто участвовали гены членов семейства Vγ1-Jy1.3 (50%, 9/18) и Vγ1-Jy1.1 (33,33%, 6/18). Графическое распределение представлено на рис. 2.

Методология выявления и мониторинга минимальной остаточной болезни базировалась на экспериментальной модели, воспроизводимой при каждом анализе. Каждое измерение сопровождалось построением двух калибровочных кривых:

Значимость идентификации реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе

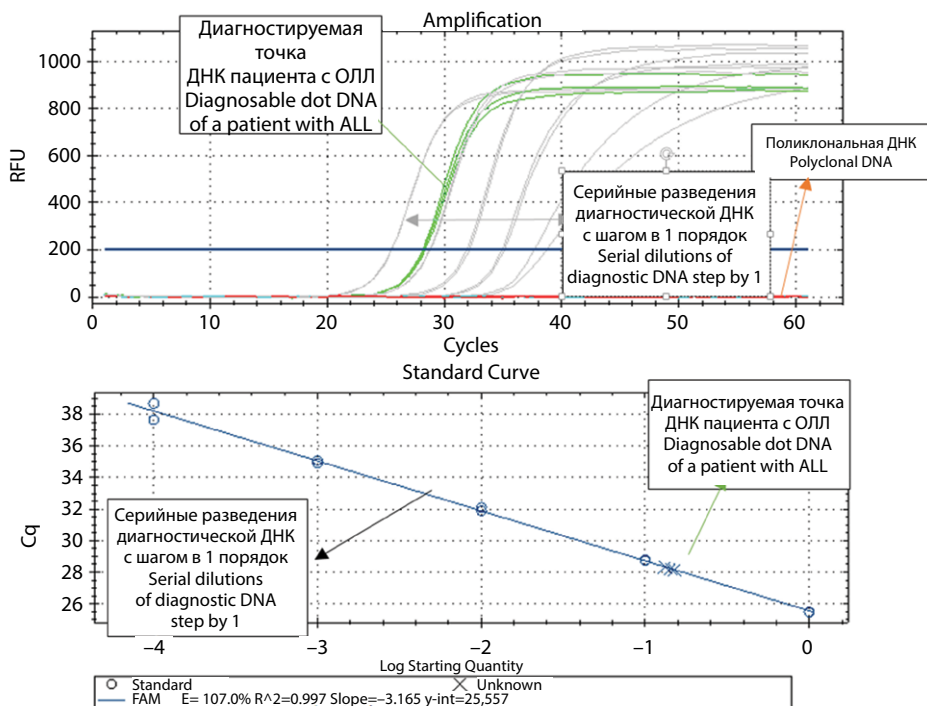


Рис. 4. Выполнение калибровки и построение стандартной калибровочной кривой для пациента с ОЛЛ при анализе МОБ для АСО-праймера VH3_F1. Чувствительность данной мишени составляет 10^{-4}

Примечания: зеленая амплификационная кривая – диагностируемая точка ДНК пациента на этапе лечения; красная амплификационная кривая – поликлональная ДНК; серые амплификационные кривые – серийные разведения диагностической ДНК с шагом в 1 порядок; Slope – угловой коэффициент; R – коэффициент корреляции; E – эффективность ПЦР; int – точка пересечения стандартной прямой оси ординат.

Fig. 4. Performing calibration and building a standard calibration curve, for an ALL patient, in the analysis of MRD for ASO primer VH3_F1. The sensitivity of this target is 10^{-4}

Notes: the green amplification curve is the diagnosable point of the patient's DNA at the stage of treatment; red amplification curve – polyclonal DNA; gray amplification curves – serial dilutions of diagnostic DNA with a step of 1 order; Slope – slope; R – Correlation coefficient; E – PCR efficiency; int is the point of intersection of the standard straight y-axis.

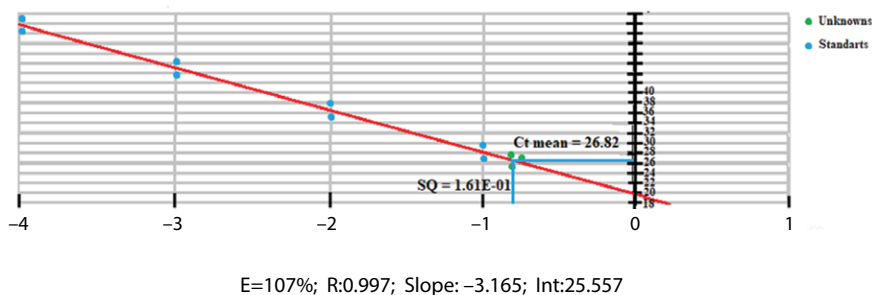


Рис. 5. Расчет уровня SQ по калибровочной кривой, мишень VH3_F1 для пациента с ОЛЛ. $SQ=1,61 \times 10^{-1}$
Fig. 5. Calculation of the SQ level from the calibration curve, target VH3_F1 for a patient with ALL. $SQ=1,61 \times 10^{-1}$



для контрольного гена – калибровку использовали для нормализации количества ДНК между образцами (рис. 3) и для мишени МОБ – использовали расчет уровня МОБ в follow up образцах (рис. 4).

Каждую калибровку количественно характеризовали следующими параметрами:

- slope (наклон), или угловой коэффициент (численно равен $\Delta Ct/\Delta SQ$ или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс);
- коэффициент корреляции (R): рассчитывался как коэффициент Пирсона между разными разведениями;
- эффективность ПЦР – указывает количество ПЦР продукта относительно теоретически расчетного в процентах;
- интерсепт (intercept) – точка пересечения стандартной прямой оси ординат, количественно выражается в значении Ct условно (или реально) нулевого уровня разведения ($SQ=0$), т. е. среднее Ct диагностической ДНК.

Результаты построения калибровочной кривой для одного пациента с ОЛЛ представлены на рис. 3 и 4.

Диагностика минимальной остаточной болезни

Для количественной оценки МОБ мы использовали метод «стандартной кривой», который позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (Ct) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражает количество мишени в логарифмическом виде относительно эталонного образца (диагностической ДНК), принятого за 1. Принцип определения SQ показан на рис. 5.

При генерации отчета в программе запуска ПЦР в режиме реального времени прибор автоматически производит средние значения Ct и SQ для всех образцов. Значение SQ мишени в образцах МОБ не отражает точно уровень МОБ, поскольку искажения вносит количество ДНК всех образцов, внесенных в реакцию. Для учета количества ДНК осуществлялась нормализация по контрольному гену. Для этого точно так же, как представлено на рис. 3 и 4, определяли значение SQ для количества ДНК. В результате для каждого образца ДНК, участвующего в амплификации, включая диагностическую ДНК, получали два значения SQ – для мишени МОБ и для количества ДНК.

Окончательно уровень МОБ рассчитывали по формулам:

$$\text{Поправочный коэффициент (K ref)} = \frac{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(D - DNA)}}$$

$$\text{Снижение мишени} = \frac{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(D - DNA)}}$$

$$\text{Нормализованное снижение мишени} = \frac{\text{K ref (follow up)}}{\text{Снижение мишени (follow up)}}$$

$$\text{МОБ} = \frac{1}{\text{Нормализованное снижение мишени}}$$

Подробное описание расчета уровня МОБ представлено в инструкции по применению [14].

Клиническое заключение об измерении уровня МОБ в ходе лечения пациентов с ОЛЛ

В результате анализ МОБ был произведен для 69 пациентов (из 81 пациента, первоначально взятого в исследование, для 9 не удалось идентифицировать реаранжировки, и для 3 пациентов не была получена достаточная специфичность и/или чувствительность праймеров), из них с первичным ОЛЛ – 28 пациентов, с рецидивом ОЛЛ – 41 пациент. Чувствительность детекции опухолевых клеток методом АСО-ПЦР индивидуальна и в среднем составила 10^{-5} . Для пациентов с диагнозом «острый лимфобластный лейкоз», получающих лечение по протоколу ALL MB-2008, показатели МОБ определялись на 15-е и 36-е сутки индукционной терапии, а также на 52-й и 100-й дни консолидирующей терапии. Для пациентов с диагнозом «рецидив острого лимфобластного лейкоза» показатели МОБ определялись перед каждым блоком полихимиотерапии.

У всех пациентов с острым лимфобластным лейкозом наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии. Среди пациентов с первичным ОЛЛ у 11 (39,28%) определялась молекулярная ремиссия на этапе окончания индукционной терапии (36-е сутки терапии), у 3 (10,71%) пациентов молекулярная ремиссия определялась на этапе I блока консолидирующей терапии, у 5 (17,85%) пациентов ремиссия была достигнута к 100-му дню терапии (этап: консолидация II), у 9 (32,14%) пациентов не констатировано молекулярной ремиссии в исследуемый период времени.

У пациентов с рецидивом острого лимфобластного лейкоза также наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии, за исключением 3 (7,31%) пациентов, у которых наблюдался рост МОБ. У 22 (53,65%) определялась молекулярная ремиссия на этапе терапии, у 12 (29,26%) пациентов наблюдалось снижение показателей МОБ до уровня предела чувствительности метода 10^{-5} , оставшиеся 4 (9,75%) пациента находятся на стадии наблюдения.

■ ВЫВОДЫ

1. Мониторинг минимальной остаточной болезни с высокой чувствительностью («молекулярная ремиссия») имеет большое прогностическое значение для пациентов с ОЛЛ, особенно группы высокого риска, при лечении рецидива или после трансплантации ТГСК. В настоящей статье приведены результаты по разнообразию и частотам выявляемых при ОЛЛ мишенях МОБ, и их практическое использование в диагностике.
 2. Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях ОЛЛ и в 95,8% пригодны для ПЦР мониторинга минимальной остаточной болезни.
 3. ПЦР в реальном времени позволяет количественно измерять низкие уровни МОБ с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах лечения.
-



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Barrett A.J., Battiwala M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.* 2010;3(4):429–441.
2. Pasquini M., Zhu X. Center for International Blood and Marrow Transplant Research [Electronic resource]: *Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides*, 2015. Available at: <http://www.cibmtr.org>.2015 (accessed 05.10.2016).
3. Mielcarek M., Storer B.E., Flowers M.E., Storb R., Sandmaier B.M., Martin P.J. Outcomes among Patients with Recurrent High-Risk Hematologic Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(10):1160–1168.
4. Kröger N., Miyamura K., Bishop M.R. Minimal Residual Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2011;17(1 Suppl):94–100.
5. Nagafuji K., Miyamoto T., Eto T., Kamimura T., Taniguchi S., Okamura T., Ohtsuka E., Yoshida T., Higuchi M., Yoshimoto G., Fujisaki T., Abe Y., Takamatsu Y., Yokota S., Akashi K., Harada M. *Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study)*. 2013;6:14.
6. Athale U.H., Gibson P.J., Bradley N.M., Malkin D.M., Hitzler J; POGO MRD Working Group. Minimal Residual Disease and Childhood Leukemia: Standard of Care Recommendations from the Pediatric Oncology Group of Ontario MRD Working Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(6):973–982.
7. Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood.* 2015;125(26):3996–4009.
8. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology.* 2010:7–12.
9. Brüggemann M., Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv.* 2017;1(25):2456–2466.
10. Galaktionov V. *Immunology*. M.: Publishing house. Center "Academy", 2004;528. (in Russian)
11. Pongers-Willems M.J., Seriu T., Stolz F., d'Aniello E., Gameiro P., Pisa P., Gonzalez M., Bartram C.R., Panzer-Grumayer E.R., Biondi A., San Miguel J.F., Dongen J.J. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999;13:110–118. doi: 10.1038/sj/leu/2401245.
12. Velden V.H., Cazzaniga G., Schrauder A., Hancock J., Bader P., Panzer-Grumayer E.R., Flohr T., Sutton R., Cave H., Madsen H.O., Cayuela J.M., Trka J., Eckert C., Foroni L., Zur Stadt U., Beldjord K., Raff T., Schoot C.E., Dongen J.J. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia.* 2007;21:604–611.
13. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., Garcia-Sanz R., Krieken J.H., Droese J., Gonzalez D., Bastard C., White H.E., Spaargaren M., Gonzalez M., Parreira A., Smith J.L., Morgan G.J., Kneba M., Macintyre E.A. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003; 17:2257–2317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202
14. Lutskevich D., Gil A., Stolyarova E., Lipai N., Meleshko A. *Method for determining residual tumor cells in patients with acute lymphoblastic leukemia: instructions for use No. 122-1120: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus on December 24, 2020*. State Institution "Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology". Minsk, 2020; 18. (in Russian)
15. Meleshko A., Savva N., Fedasenka U., Romancova A., Krasko O., Eckert C., von Stackelberg A., Aleinikova O. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk. Res.* 2011;10(35):1312–1320.



Астрамович В.А.¹✉, Баровская Ю.А.^{1,2}, Капуза Д.Р.¹, Наумович М.Г.¹, Стёганцева М.В.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Метод выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 у пациентов детского возраста с острым миелоидным лейкозом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Астрамович В.А. – дизайн исследования, сбор материала, пробоподготовка, выполнение молекулярного исследования, написание текста; Баровская Ю.А. – лечащий врач положительного пациента, описание клинического случая; Капуза Д.Р. – выполнение и описание цитогенетического исследования; Наумович М.Г. – куратор нового протокола лечения острых миелоидных лейкозов MM2020, включающего диагностику NUP98-NSD1, редактирование текста; Стёганцева М.В. – написание текста, дизайн исследования, редактирование.

Подана: 20.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: veronika.astramovich@gmail.com

Резюме

Введение. Химерный транскрипт NUP98-NSD1 характеризует подгруппу пациентов с острым миелоидным лейкозом с плохим прогнозом и общей выживаемостью ниже 10%, что служит основанием для разработки технологии выявления данного транскрипта, а также оценки клинической значимости его определения.

Цель. Разработать наиболее эффективный и подходящий метод диагностики NUP98-NSD1.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции проведено ретроспективное исследование 31 пациента с острым миелоидным лейкозом на наличие химерного транскрипта NUP98-NSD1.

Результаты. Отработан эффективный метод ПЦР-диагностики химерного онкогена NUP98-NSD1 с чувствительностью 10^{-2} и специфичностью 100%. По результатам ретроспективного исследования обнаружен 1 пациент (3%) с искомой транслокацией (подтверждено секвенированием), у которого изначально был установлен нормальный кариотип. Дополнительный анализ методом FISH продемонстрировал наличие реаранжировки гена NUP98. Описан клинический случай, связанный с исследованием пациента.

Заключение. Описанный метод ПЦР-анализа позволяет проводить диагностику у пациентов с ОМЛ на наличие химерного транскрипта NUP98-NSD1. Целесообразно включать в аналитическое исследование пациентов с нормальным кариотипом и без известных рекуррентных транслокаций.

Ключевые слова: химерный транскрипт NUP98-NSD1, острый миелоидный лейкоз, полимеразная цепная реакция, пациенты детского возраста, клинический случай



Astramovich V.¹✉, Barouskaya Y.^{1,2}, Kapuza D.¹, Navumovich M.¹, Stegantseva M.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Method of the NUP98-NSD1 Detection in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Astramovich V. – research design, material collection, processing, text writing; Barouskaya Y. – treating physician of the positive patient, description of the clinical finding; Kapuza D. – performance and description of cytogenetic research; Navumovich M. – curator of the new protocol for the treatment of acute myeloid leukemia MM2020, including the diagnosis of NUP98-NSD1, text editing; Stegantseva M. – text writing, research design, editing.

Submitted: 20.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: veronika.astramovich@gmail.com

Abstract

Introduction. The NUP98-NSD1 chimeric transcript characterizes a subgroup of patients with poor prognosis acute myeloid leukemia (AML) and overall survival below 10%, which proves the great importance of identifying and studying this transcript.

Purpose. To develop the effective and appropriate method for NUP98-NSD1 detection.

Materials and methods. A retrospective study of 31 AML patients for NUP98-NSD1 were performed using polymerase chain reaction.

Results. Effective method for NUP98-NSD1 screening were developed. Test has 10⁻² sensitivity and 100% specificity. According to the results of a retrospective study, 1 patient (3%) with initially established normal karyotype was found with the desired translocation (confirmed by sequencing). Additional FISH analysis demonstrated the presence of the NUP98 gene rearrangement. The clinical case of the studied patient is described.

Conclusion. The described PCR method is an effective tool to diagnose patients with AML for NUP98-NSD1. It is advisable to test patients with a normal karyotype and without known recurrent translocations.

Keywords: NUP98-NSD1 chimeric transcript, acute myeloid leukemia, polymerase chain reaction, pediatric patients, clinical case

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное заболевание, в основе которого лежат функционально различные генетические aberrации. Многие из ранее идентифицированных молекулярных событий имеют подтвержденную ассоциацию с прогнозом заболевания. Общая выживаемость при ОМЛ у пациентов детского возраста (среди детей до 15 лет) составляет примерно 70%, в то время как в группе высокого риска – 55% [1, с. 1]. К числу неблагоприятных aberrаций, ведущих к формированию ОМЛ, относятся транслокации нуклеопорина 98 кДа (NUP98), расположенного на хромосоме 11p15 [2, с. 3645]. Идентифицировано более 20 различных хромосомных перестроек с участием данного гена [3, с. 684].

При различных гематологических злокачественных новообразованиях в транслокации с NUP98 могут участвовать как гомеобоксные (HOXA9, HOXC11, HOXD13), так и негемеобоксные гены (JAR1D1A, DDX10, TOP1 и NSD1) [4, с. 1054]. Среди всех партнеров для NUP98, идентифицированных к настоящему времени, транслокация NUP98-NSD1 t(5;11) является наиболее частой и присутствует у 4–7% детей с ОМЛ [1, с. 13]. В частности, данная перестройка встречается у 5% пациентов с ОМЛ в диапазоне от 2 до 17 лет [4, с. 1053]. NUP98 играет важную роль в ядерно-цитоплазматическом обмене макромолекул через ядерную мембрану.

NUP98-NSD1-положительные пациенты с ОМЛ слабо отвечают на проведение паллиативной химиотерапии [5, с. 1]. В материалах опубликованных ранее исследований сообщается, что наличие данного химерного транскрипта характеризует подгруппу ОМЛ с плохим прогнозом и общей выживаемостью ниже 10% [4, с. 1053]. В связи с этим выявление и изучение данной транслокации у детей с ОМЛ имеет большое значение для повышения эффективности их лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработать наиболее эффективный и подходящий метод диагностики NUP98-NSD1.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании был использован материал костного мозга 31 пациента с острым миелоидным лейкозом, диагностированного в РНПЦ ДОГИ в период с 2018 по 2021 год, с отсутствием других рекуррентных транслокаций.

Выделение РНК, синтез кДНК

Осадок клеток лизировали в 1 мл TRIzol (Invitrogen, США). РНК выделяли методом спиртовой преципитации. Качество РНК оценивали на спектрофотометре DS-11 FX+ (DeNovix, США). В синтез кДНК брали 1 мкг РНК. Реакционная смесь включала обратную транскриптазу SuperScript™ III (Invitrogen, США), 5X буфер синтеза первичной цепи, ингибитор рибонуклеаз, рандомные праймеры, дитиотреитол. Синтез проводили согласно протоколу: 25 °C – 5'; 50 °C – 60'; 70 °C – 15'; 4 °C – ∞.

Полимеразная цепная реакция

Для выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 использовали следующие праймеры: прямой – 5'-TCTTGGTACAGGAGCCTTTG-3'; обратный – 5'-TCCAAAAGCCACTTGCTTGGC-3' [6, с. 1265]. В качестве положительного контроля использовалась кДНК пациента, у которого была обнаружена и подтверждена секвенированием данная транслокация (материал любезно предоставлен НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия). ПЦР-смесь, используемая для отрицательного контроля, вместо кДНК пациента содержала деионизированную воду. ПЦР-смесь включала: DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher scientific, США), праймеры (2 ммоль/л). Протокол ПЦР: 95 °C – 3' (1 цикл); 96 °C – 45"; 58 °C – 45"; 72 °C – 1' (40 циклов); 72 °C – 7' (1 цикл); 12 °C – ∞. Продукты ПЦР визуализировали в агарозном геле 1,5% (Calbiochem, США).



Секвенирование

ПЦР-продукт очищали от праймер-димеров и неизрасходованных компонентов реакции в 9%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза. Определение нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР проводили путем прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Реакцию секвенирования проводили в объеме 10 мкл: 1 мкл буфера для секвенирования BigDye terminator v3.1 Buffer, 1 мкл флуоресцентно меченных нуклеотидов BigDye (Applied Biosystems, США), 4 мкл прямого или обратного праймера с концентрацией 2,5 пмоль, 100 нг матрицы, вода до 10 мкл. Протокол реакции: 96 °C – 1 мин.; 25 циклов: 96 °C – 10 сек., 50 °C – 5 сек., 60 °C – 4 мин. Очищенный ПЦР-продукт разводили в 15 мкл формамида и денатурировали 5 минут при 95 °C. Для анализа сиквенсограмм использовали программы Sequencing Analysis 5.2, NCBI BLAST.

Цитогенетическое исследование

Кариотипирование лейкемических клеток выполнялось методом дифференциального G-окрашивания 24-часовой культуры клеток КМ (MarrowMAX Bone Marrow Medium). Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) проводили на интерфазных ядрах с использованием локус-специфического двухцветного ДНК-зонда для гена NUP98 (11p15.4) (Dual Color Break Apart Probe, Zytovision, Germany) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-биологический метод выявления транслокации NUP98-NSD1

Для амплификации химерного транскрипта NUP98-NSD1 была применена технология Hotstart, которая позволяет повысить чувствительность и специфичность ПЦР-реакции. Специфичность данного метода была проверена с помощью проведения ПЦР с кДНК, полученной из 5 образцов костного мозга здоровых доноров и 5 образцов периферической крови здоровых доноров, а также положительного контроля (материал любезно предоставлен НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия). В ходе визуализации ПЦР-продуктов с помощью электрофореза ни в одном образце, кроме положительного контроля, ничего не было выявлено. Чувствительность метода была установлена с помощью последовательных десятикратных разведений заведомо положительной кДНК пациента, у которого была обнаружена транслокация NUP98-NSD1 и подтверждена методом секвенирования в лаборатории НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (рис. 1).

По результатам исследования установлено, что чувствительность метода составляет 10^{-2} , что позволяет использовать его в качестве инициальной диагностики после постановки диагноза ОМЛ. Для верификации метода был проведен ретроспективный анализ пациентов, диагностированных в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (д. Боровляны, Беларусь).

Выявление транслокации NUP98-NSD1 у пациентов с ОМЛ

В период с 2018 по 2021 год в РНПЦ ДОГИ было диагностировано 73 пациента с первичным ОМЛ, из них у 35 не было обнаружено наиболее распространенных

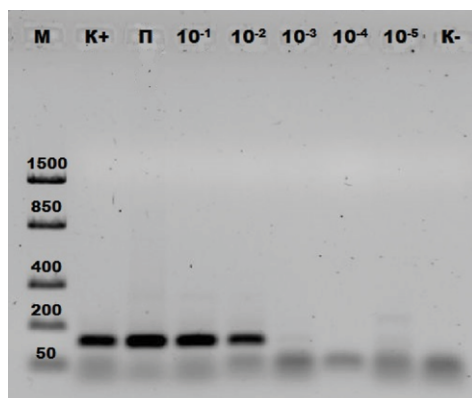


Рис. 1. Последовательные десятикратные разведения кДНК пациента с NUP98-NSD1

Примечания: М – маркер молекулярного веса; П – пациент с транслокацией NUP98-NSD1; 10⁻¹–10⁻⁵ – последовательные разведения; К+ – положительный контроль; К– – отрицательный контроль.

Fig. 1. Serial 10-fold dilutions of cDNA from patients with NUP98-NSD1

Notes: M – molecular weight marker; P – patient with NUP98-NSD1 translocation; 10⁻¹–10⁻⁵ – serial dilutions; K+ – positive control; K– – negative control.

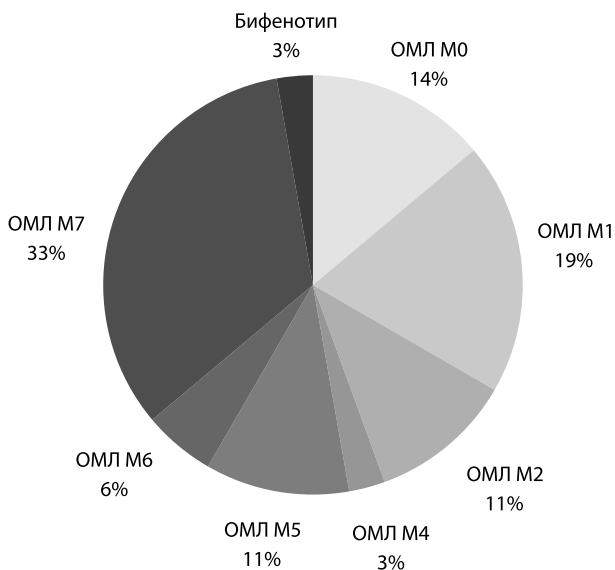


Рис. 2. Процентное соотношение морфологических типов ОМЛ по FAB-классификации, обнаруженных у исследуемых пациентов без установленного молекулярного диагноза

Fig. 2. Percentage of AML morphological types according to the FAB classification in the studied patients without established molecular diagnosis



молекулярно-генетических перестроек. В процентном соотношении в группе исследованных пациентов без установленного молекулярного диагноза были диагностированы следующие типы ОМЛ согласно FAB-классификации (Франко-американо-британская классификация): ОМЛ М0 – 14%, ОМЛ М1 – 19%, ОМЛ М2 – 11%, ОМЛ М4 – 3%, ОМЛ М5 – 11%, ОМЛ М6 – 6%, ОМЛ М7 – 33%, пациент с бифенотипом (В-ОЛЛ/ОМЛ) – 3% (рис. 2).

В рамках проводимого исследования был проанализирован 31 образец костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Среди них был выявлен один пациент, у которого обнаружено наличие химерного онкогена NUP98-NSD1 (3%) (П5 на рис. 3А). Наличие искомого транскрипта было подтверждено методом прямого секвенирования по Сэнгеру. На рис. 3В продемонстрирована точка слияния двух генов.

Разрыв произошел в 12-м экзоне гена NUP98 и 6-м экзоне гена NSD1. Ген NSD1 кодирует белок, который функционирует как гистонметилтрансфераза. Добавляя метильную группу к гистонам, гистоновые метилтрансферазы регулируют активность определенных генов и могут включать и выключать их по мере необходимости. Фермент NSD1 контролирует активность генов, участвующих в нормальном росте и развитии. Перестройка генетического материала, связанная с острым миелоидным лейкозом у детей, приводит к аномальному слиянию гена NSD1 на хромосоме 5 с геном NUP98 на хромосоме 11. Эта транслокация приобретает в течение жизни человека и присутствует только в раковых клетках. Исследования показывают, что слитый ген NUP98-NSD1 включает гены, которые способствуют росту незрелых клеток крови, и блокирует процессы, которые отключили бы эти гены [7, с. 1]. NUP98-NSD1 изменяет конформацию хроматина, связывая гистоновые хвосты и считывая активные метки, тем самым модифицируя нормальную регуляцию генов. Клетки костного мозга, трансдуцированные NUP98-NSD1, увеличивают экспрессию Noxa5, a7, a9, a10 и Meis1. Было показано, что NUP98-NSD1 связывает и активирует промоторы Noxa7 и Noxa9. Таким образом, NUP98-NSD1 ведет себя как мощный активатор транскрипции в локусе Noxa, объединяя 2 эпигенетических модификатора, которые подготавливают хроматин к активной транскрипции генов, наряду с доменом PHD, который нацеливается на промотор Noxa9. Одновременно с этим данная транслокация предотвращает эпигенетическое молчание и репрессию с помощью комплекса репрессора polycomb, который обычно подавляет локус Noxa во время гемопоэтической дифференцировки [8, с. 6251].

При инициальном цитогенетическом исследовании материала костного мозга данного пациента методом G-окрашивания был установлен нормальный кариотип 46, XY (рис. 4А).

Транслокация NUP98-NSD1 не была обнаружена, т. к. она относится к категории криптических. Такие мелкие скрытые aberrации выявляются только молекулярными методами, такими как ПЦР и секвенирования [9, с. 84]. По результатам ПЦР было проведено дополнительное ретроспективное FISH-исследование материала костного мозга данного пациента, по результатам которого установлена трисомия 8-й хромосомы, а также клетки с паттерном сигнала 1F(fusion)1R(red)1G(green), соответствующим реаранжировке гена NUP98 (рис. 4В).

Исследован клинический случай пациента, у которого была обнаружена данная транслокация. Характер течения заболевания пациента подтверждает неблагоприятный прогноз, наблюдаемый при наличии NUP98-NSD1.

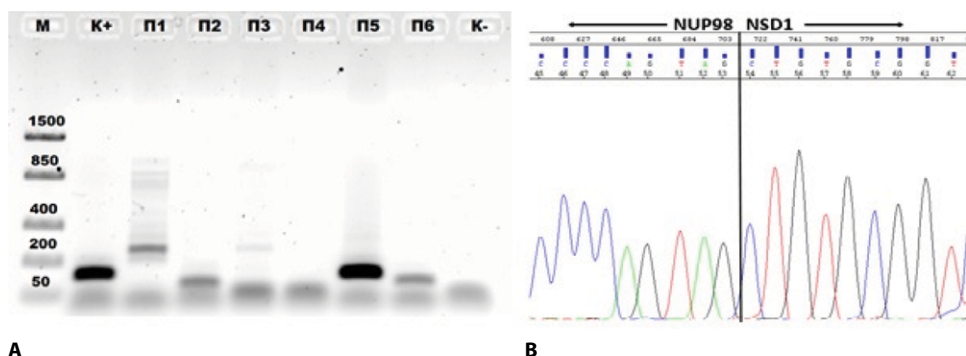


Рис. 3. А – результат электрофореза; В – результат секвенирования по Сэнгеру

Примечания: М – маркер молекулярного веса; П1–П6 – исследуемые пациенты; К+ – положительный контроль; К– – отрицательный контроль.

Fig. 3. A – the result of electrophoresis; B – Sanger sequencing result

Notes: M – molecular weight marker; P1–P6 – studied patients; K+ – positive control; K– – negative control.

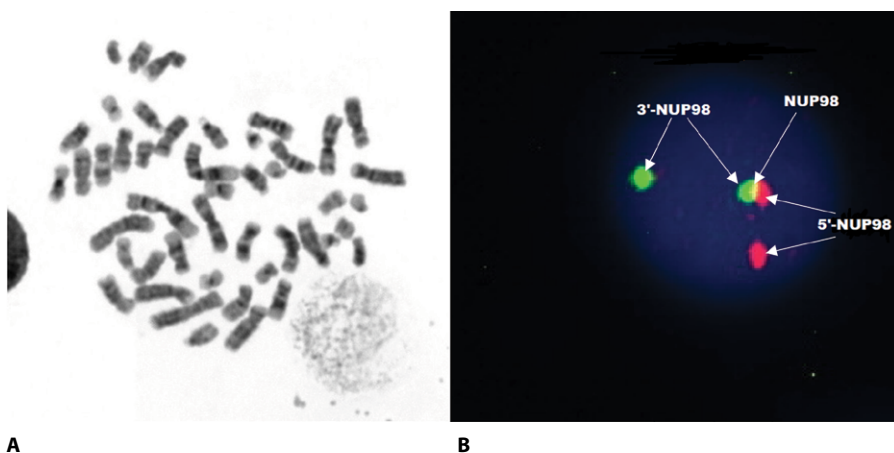


Рис. 4. А – метафазная пластинка пациента, окрашенная методом G-бэндинг; В – результат исследования методом FISH в интерфазных ядрах, характерный для перестройки гена NUP98
Fig. 4. A – patient metaphase, colored by the G-banding method; B – the result of the FISH study in interphase nuclei, specific the rearrangement of the NUP98 gene

Клинический случай

Пациент, 14 лет, ребенок от третьей беременности, третьих родов. Привит по возрасту. Из перенесенных заболеваний отмечались острые респираторные инфекции, ветряная оспа. На диспансерном учете не состоял. В ноябре 2019 г. поступил в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с жалобами на слабость, повышение температуры тела до фебрильных цифр. Из анамнеза известно, что за месяц



до госпитализации отмечались подъемы температуры до фебрильных значений, за две недели до госпитализации обнаружено увеличение подмышечного лимфоузла. Лечился амбулаторно, получал антибактериальную терапию. В общем анализе крови (ОАК): эритроциты – $3,2 \times 10^{12}/л$, гемоглобин – 90 г/л, тромбоциты – $600 \times 10^9/л$, лейкоциты – $22,3 \times 10^9/л$, бласты – 55%. В миелограмме: пунктат богат клеточными элементами, большое количество тромбоцитов разной степени зрелости, функционируют. Бласты составляют 70%. Исходя из морфологических и цитохимических признаков, данная картина соответствует М4 по FAB-классификации. Молекулярными методами стандартные химерные онкогены не были обнаружены. При цитогенетическом исследовании кариотип 46, XY. Пациент был стратифицирован в промежуточную группу риска и получал полихимиотерапию по протоколу ОМЛ-ММ-2014 (два курса индукции в режиме интенсивного «тайминга» ADE-HAM (цитарабин, даунорубин, вепезид); курс HAM (высокодозный цитарабин, митоксантрон) начинается на 14-й день от начала курса ADE; два курса консолидации: HD-ARA-C+IDA (высокодозный цитарабин, идарубин) и AME-H (высокодозный цитарабин, вепезид, митоксантрон)). Ремиссия констатирована после проведения двойной индукции. Далее пациенту планировалось проведение третьего консолидирующего блока с введением натуральных киллерных клеток от гаплоидентичного донора, однако из-за длительного цитопенического синдрома блок полихимиотерапии не проводился. В ноябре 2020 г. констатирован изолированный костномозговой рецидив. При цитогенетическом исследовании выявлен клон клеток с трисомией 8-й хромосомы. Начато противорецидивное лечение, пациент получил курс полихимиотерапии FLAG+IDA (флударабин, идарубин, высокодозный цитарабин, G-CSF). Через три недели от установления рецидива у пациента была диагностирована COVID-19-инфекция, тяжелое течение (двусторонняя пневмония с формированием фиброателектазов). С ноября 2020 г. по май 2021 г. пациент получал активное комплексное лечение против COVID-19 (кислородотерапия, глюкокортикостероиды, анти-COVID-19-свежезамороженная плазма курсами, ремдесивир). Длительно персистирующая COVID-19-инфекция привела к невозможности продолжения специального лечения. В костном мозге бласты составляли до 5%, однако восстановления ростков гемопоэза не было. У пациента сохранялась зависимость от гемотрансфузий. В апреле 2021 г. с целью поиска дополнительных мишеней для уточнения прогноза и оценки минимальной остаточной болезни было проведено таргетное секвенирование ДНК и обнаружена патогенная мутация в гене NRAS (герминогенная). NRAS не имеет показаний для таргетной терапии. Учитывая невозможность проведения специальных методов лечения (высокодозная полихимиотерапия и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток) ввиду активной COVID-19-инфекции и развившихся тяжелых инфекционно-токсических осложнений (синдром Иценко – Кушинга, медикаментозная гипергликемия, стероидная миопатия, умеренный тетрапарез с дистрофией мышц и формированием сгибательных контрактур в коленных суставах, диабетическая полинейропатия, атрофия зрительных нервов, токсическая энцефалопатия, остеопороз, снижение индекса Карновского до 40%), пациент переведен в паллиативную группу медицинской помощи. Пациенту была назначена терапия сдерживания. Смерть наступила от прогрессирования лейкоза в январе 2022 г.

При своевременной диагностике на наличие транскрипта NUP98-NSD1 лечение данного пациента проводилось бы по протоколу для высокого риска, который включает в себя проведение трансплантации костного мозга в первой ремиссии, что могло повысить шансы на выздоровление.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный метод выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 позволяет проводить диагностику пациентов с ОМЛ на наличие данного транскрипта. Представленный метод является быстрым в исполнении, экономичным, эффективным и обладает достаточной чувствительностью, необходимой для своевременной диагностики пациентов с ОМЛ, и позволяет сформировать адекватную тактику лечения, что повышает шансы пациентов на благоприятный исход заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Niktoreh N., Walter Ch., Zimmermann M. Mutated WT1, FLT3-ITD, and NUP98-NSD1 Fusion in Various Combinations Define a Poor Prognostic Group in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Oncology*. 2019;373(12):1–15. doi: 10.1155/2019/1609128
2. Hollink I.H.J.M., van den Heuvel-Eibrink M.M., Arentsen-Peters S.T.C.J.M. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011;118(13):3645–3656. doi: 10.1182/blood-2011-04-346643
3. Shiba N., Ichikawa H., Taki T. NUP98-NSD1 Gene Fusion and Its Related Gene Expression Signature Are Strongly Associated with a Poor Prognosis in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;52:683–693. doi: 10.1002/gcc.22064
4. Akiki S., Dyer S.A., Grimwade D. NUP98-NSD1 Fusion in Association with FLT3-ITD Mutation Identifies a Prognostically Relevant Subgroup of Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients Suitable for Monitoring by Real Time Quantitative PCR. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;52:1053–1064. doi: 10.1002/gcc.22100
5. Mohanty S., Jyotsana N., Sharma A. Targeted Inhibition of the NUP98-NSD1 Fusion Oncogene in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2020;2766(12):1–17. doi: 10.3390/cancers12102766
6. Jaju R.J., Fidler C., Haas O.A. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(4):1264–1267. doi: 10.1182/blood.v98.4.1264
7. Berdasco M., Ropero S., Setien F. Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(51):21830–21835. doi: 10.1073/pnas.0906831106
8. Gough S.M., Slape Ch.I., Aplan P.D. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*. 2011;118(24):6247–6257. doi: 10.1182/blood-2011-07-328880
9. Domninskiy D.A. Molecular mechanisms of leukemogenesis. *Oncohematology*. 2011;3:82–93. doi: 10.17650/1818-8346-2012-7-1-46-54. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PL.2022.11.3.006>
УДК 616.284-002.2-074\078:[616-002+577.125]



Юревич В.В.¹✉, Шестакова Е.В.¹, Муравейник Н.П.²

¹ Республиканский научно-практический центр оториноларингологии,
Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

Клиническая и патогенетическая информативность сочетанного исследования лабораторных показателей воспаления и состояния липидного обмена у пациентов с хроническим эпитимпано- антральным гнойным средним отитом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: обзор литературы, подбор и анализ данных – Юревич В.В.; концепция и дизайн исследования – Юревич В.В., Шестакова Е.В., Муравейник Н.П.

Подана: 23.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: fender2ele@gmail.com

Резюме

Цель. Установить характер сочетанных изменений показателей биомаркеров воспаления и липидного (липопротеинового) спектра сыворотки крови как одного из потенциально возможных механизмов формирования хронического эпитимпано-антрального гнойного среднего отита (Н66.2, МКБ-10).

Материалы и методы. Для установления показателей лабораторных тестов, отражающих синдром воспаления и состояние липидного (липопротеинового) спектра сыворотки крови, проведено одномоментное когортное исследование контингента пациентов из 56 человек, включающего в себя 42 пациентов с диагнозом «хронический эпитимпано-антральный гнойный средний отит» (с холестеатомой и без) и 14 практически здоровых человек, составивших контрольную группу, которая по возрастно-половому составу соответствовала группе пациентов, страдающих гнойным отитом.

Результаты. У всех пациентов выполнено количественное определение содержания в сыворотке крови интерлейкина-6, С-реактивного белка, общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности, холестерина липопротеинов низкой плотности, триацилглицеринов, апобелка-А, апобелка-В, липопротеина (а). Установлено, что показатели концентрации интерлейкина-6, липопротеина (а), апобелка-В и липопротеинов низкой плотности достоверно увеличены у пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой по сравнению с аналогичными значениями представителей контрольной группы пациентов ($p < 0,05$).

Выводы. Сочетанное исследование факторов воспаления и липидного спектра сыворотки крови показало увеличение ее атерогенного потенциала на фоне усугубления выраженности метаболических проявлений воспалительного процесса,

что может являться важным патогенетическим звеном формирования холестеатомы и ее рецидивирования. Полученные данные являются основанием к проведению дальнейших исследований на предмет установления лабораторно-диагностической и прогностической значимости выявленных метаболических нарушений.

Ключевые слова: хронический эпитимпано-антральный гнойный средний отит, холестеатома, интерлейкин-6, С-реактивный белок, холестерин, триацилглицерины, липопротеиновое распределение холестерина, липопротеин (а), апобелок-В

Yurevich V.¹✉, Shestakova E.¹, Muraveinik N.²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Otorhinolaryngology, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology", Minsk, Belarus

Clinical and Pathogenetic Information Value of a Combined Study of Laboratory Indicators of Inflammatory and the State of Lipid Metabolism in Patients with Chronic Suppurative Otitis Media Involving Epitympanum

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: literature review, selection of analytical data and analysis – Yurevich V.; concept and design of the study – Yurevich V., Shestakova E., Muraveinik N.

Submitted: 23.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: fender2ele@gmail.com

Abstract

Purpose. Determine the concentration levels of inflammation indicators (interleukin-6, C-reactive protein) and lipid spectrum of blood serum in patients with chronic suppurative otitis media involving epitympanum, both with and without cholesteatoma, who underwent surgical treatment at the Republican Scientific and Practical Center of Otorhinolaryngology from August to December 2021.

Materials and methods. To establish the indicators of laboratory tests reflecting the inflammation syndrome and the state of the lipid (lipoprotein) spectrum of the blood serum, a one-stage cohort study of a contingent of patients of 56 people, including 42 patients with a diagnosis of "Chronic suppurative otitis media involving epitympanum" (with and without cholesteatoma) was carried out and 14 practically healthy people who made up the control group, which in terms of age and sex composition corresponded to the group of patients suffering from suppurative otitis media.

Results. All patients underwent quantitative determination of serum levels of interleukin-6, C-reactive protein, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, triacylglycerols, apoprotein-A, apoprotein-B, lipoprotein (a). It was established that the concentrations of interleukin-6, lipoprotein (a), apoprotein-B and low-density lipoproteins were significantly increased in patients with chronic suppurative



otitis media involving epitympanum with cholesteatoma compared with similar values in the control group of patients ($p < 0.05$).

Conclusions. It remains relevant to conduct further studies to establish the levels of interleukins and lipid spectrum indicators in order to identify markers-predictors of cholesteatoma recurrence in patients with chronic suppurative otitis media involving epitympanum.

Keywords: chronic suppurative otitis media involving epitympanum, cholesteatoma, interleukin-6, C-reactive protein, cholesterol, triacylglycerols, lipoprotein distribution of cholesterol, lipoprotein (a), apoprotein-B

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема рецидивирования холестеатомы у пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом продолжает оставаться актуальной: у 24–63% из них формируется холестеатома [1, с. 5]. К сожалению, предикторы развития холестеатомы практически не установлены. По данным Азнауряна А.М., у ряда пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом обнаруживается нарушение липидного обмена, способное содействовать формированию холестеатомы [2, с. 4].

Медиаторы воспаления, в том числе интерлейкин-6 (ИЛ-6), играют центральную роль в патогенезе хронического эпитимпано-антрального гнойного среднего отита и холестеатомы, поддерживая системный и местный воспалительный ответ [3]. Наряду с этим ИЛ-6 является одним из наиболее значимых цитокинов в развитии нарушений липидного обмена [4, с. 467; 5, с. 14]. Известно также, что ИЛ-6 может играть важную роль в механизмах эпителиальной гиперпролиферации, ответственных за холестеатому. Жировая ткань является вторым по значимости источником ИЛ-6 в состоянии покоя после клеток иммунной системы [6, с. 105; 7, с. 41].

Наиболее часто встречающимися агентами, вызывающими повреждение эндотелия, являются различные вирусы или бактерии. Повреждение эндотелия (при атеросклерозе, например) в свою очередь обеспечивает проникновение в этот слой липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП). В результате накопления ХС-ЛПНП в эндотелии к местам повреждения мигрируют макрофаги, захватывающие частицы ХС-ЛПНП и накапливающие их внутри собственных клеток, что приводит к формированию бляшек в стенке сосудов [8, с. 378].

Известно, что все апопротеины способствуют формированию липидно-белковых комплексов (липопротеинов). Апобелок-А (апо-А) составляет около 70% белка липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), и его компонент апо-А1 активирует фермент лецитинхолестеролацилтрансферазу (ЛХАТ), который способствует образованию эфирсвязанного холестерина из свободной его формы. Таким образом, апо-А-1 обладает антиатерогенными свойствами. При уменьшении содержания ХС-ЛПВП и апо-А соответственно снижается их важная функция – осуществление обратного транспорта холестерина в печень, противовоспалительные и регенеративные свойства в отношении эндотелиальных клеток [6, с. 106; 9, с. 118].

Апобелок-В (апо-В) является функциональным апопротеином липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), увеличение содержания которых связано с развитием коронарного, каротидного и периферического атеросклероза. ХС-ЛПНП могут модифицироваться вследствие перекисного окисления содержащихся в них липидов и белков, образования аутоиммунных комплексов липопротеин – антитело и прочих процессов. В результате этого нарушается их взаимодействие с рецепторами печени и они становятся хемоаттрактантами для моноцитов. Моноциты, в свою очередь, превращаются в макрофаги и пенистые клетки, наполненные эфирами холестерина, которые высвобождают различные факторы роста, провоспалительные цитокины (в частности ИЛ-6), молекулы адгезии. Таким образом, апо-В характеризуется атерогенными свойствами и входит в состав хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности, липопротеинов промежуточной плотности и ХС-ЛПНП.

Липопротеин (а) (ЛП (а)) – атерогенная липопротеиновая частица, напоминающая ХС-ЛПНП и содержащая в составе молекулу апо-(А), ковалентно связанную с молекулой апо-В-100 с помощью дисульфидной связи. Уровень ЛП (а) генетически детерминирован и рассматривается как независимый биохимический маркер – предиктор атеросклероза [9].

Сходство строения ЛП (а) и белков острой фазы позволяет рассматривать его как специфический белок острой фазы при деструктивных процессах в сосудистой стенке. Уровень ЛП (а) в крови генетически детерминирован [8].

Хронический эпитимпано-антральный гнойный средний отит является мультифакториальным заболеванием, немаловажную роль в патогенезе которого играют микроорганизмы. По данным ряда авторов, одним из наиболее распространенных микроорганизмов, определяющих развитие хронического гнойного отита, является *S. aureus* [10, 11]. В исследовании Rahul Mittal et al. показано, что отопатогенный *S. aureus* использует холестеринзависимый путь для колонизации в эпителиальные клетки среднего уха человека. *S. aureus* может использовать жирные кислоты, присутствующие в липопротеинах низкой плотности пациента, чтобы обойти химическое и генетическое ингибирование бактериального синтеза жирных кислот. Это свидетельствует о решающей роли холестерина в реализации бактериальной вирулентности и клеточной инвазии [12].

По данным ряда авторов, у взрослого населения в возрасте 40–65 лет средние значения концентрации общего холестерина – 5,6 ммоль/л; средние значения концентрации триацилглицеринов у женщин – 1,2 ммоль/л, у мужчин – 1,7 ммоль/л; средние значения концентрации ХС-ЛПНП у женщин – 3,2 ммоль/л, у мужчин – 3,4 ммоль/л; средние значения концентрации ХС-ЛПВП у женщин – 1,7 ммоль/л, у мужчин – 1,3 ммоль/л; средние значения концентрации апо-В у женщин – 1,00 г/л, у мужчин – 1,16 г/л; средние значения концентрации ЛП (а) у женщин – 9,8 мг/дл, у мужчин – 8,9 мг/дл.

Средняя концентрация С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови здоровых людей – 1,5 мг/л [13, 14].

Концентрация ИЛ-6 у молодых здоровых людей составляет в среднем 2,2 пг/мл; у людей в возрасте 70±10 лет – 3,7 пг/мл [15].



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить характер сочетанных изменений показателей биомаркеров воспаления и липидного (липопротеинового) спектра сыворотки крови как одного из потенциально возможных механизмов формирования хронического эпитимпано-антрального гнойного среднего отита (Н66.2, МКБ-10).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения ИЛ-6, СРБ и липидного спектра сыворотки крови проведено одномоментное когортное исследование, охват которого составил 56 человек. Из них:

- 24 пациента с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом без холестеатомы, средний возраст пациентов составил 43,8 года, среди пациентов было 12 мужчин (50%), 12 женщин (50%);
- 18 пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой, средний возраст пациентов составил 34 года, среди пациентов было 12 мужчин (66%), 6 женщин (34%);
- 14 практически здоровых людей (контрольная группа пациентов), средний возраст которых составил 39,6 года, среди пациентов было 6 мужчин (50%), 8 женщин (50%).

Критериями включения пациентов в исследования явились:

- наличие хронического эпитимпано-антрального гнойного среднего отита как с холестеатомой, так и без нее;
- возраст пациентов 18–60 лет.

Критерии исключения пациентов из исследования следующие:

- патология со стороны сердечно-сосудистой системы;
- патология со стороны эндокринной системы;
- патология со стороны иммунной системы;
- наличие онкологического заболевания.

Взятие материала осуществлялось в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии». Определение концентраций ИЛ-6, СРБ и показателей липидного спектра проводилось в государственном

Таблица 1
Референсные значения исследуемых показателей крови
Table 1
Reference values of the studied blood parameters

| Исследуемые показатели | Мужчины | Женщины |
|---------------------------|---------------|-----------|
| Общий холестерин, ммоль/л | 3,8–5,2 | |
| ТГ, ммоль/л | 0–1,69 | |
| Апо-А, г/л | 0,95–1,86 | 1,01–2,23 |
| Апо-В, г/л | 0,49–1,71 | 0,53–1,82 |
| ЛП (а), мг/дл | 0–30 | |
| ХС-ЛПВП, ммоль/л | 2,59–4,11 | |
| ХС-ЛПНП, ммоль/л | Не менее 1,55 | |
| СРБ, мг/л | 0–5 | |
| ИЛ-6, нг/л | 0–7 | |

учреждении «Республиканский научно-практический центр «Кардиология» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

У всех пациентов выполнено исследование концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови на автоматическом иммунохимическом анализаторе Access-2 (Beckman Coulter, США), СРБ, общего холестерина, триацилглицеринов, апо-А, апо-В, ЛП (а) на автоматическом биохимическом анализаторе Architect plus C 4000 (Abbott, США). Референсные значения для исследуемых показателей крови согласно данным производителя реагентов (Beckman Coulter, Abbott; США) приведены в табл. 1.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием параметрических методов исследования, в том числе – оценки достоверности (критерий Стьюдента). Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие обозначения: m – средняя величина, δ – стандартное отклонение, p – достигнутый уровень статистической значимости. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft, Inc., США, лицензия № АХХR012E839529FA).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Определены показатели концентрации ИЛ-6, СРБ и показателей липидного спектра в сыворотке крови пациентов с хроническим эпитимпано-антральным гнойным

Таблица 2
Показатели концентрации ИЛ-6, СРБ и липидного спектра крови
Table 2
Average concentrations of IL-6, CRP and lipid spectrum parameters

| Исследуемый показатель | Пациенты с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом без холестеатомы, n=24 | Пациенты с хроническим эпитимпано-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой, n=12 | Контрольная группа пациентов, n=14 | Статистическая значимость различий |
|---------------------------|--|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | $m \pm \delta^*$ | $m \pm \delta^*$ | | |
| Холестерин общий, ммоль/л | 4,55±0,50 | 4,85±0,44 | 4,50±0,46 | $p > 0,05$ |
| Триацилглицерины, ммоль/л | 1,10±0,36 | 1,06±0,27 | 1,05±0,25 | $p > 0,05$ |
| ХС-ЛПНП, ммоль/л | 2,73±0,40 | 3,30±0,33** | 2,70±0,35 | $p < 0,05$ |
| ХС-ЛПВП, ммоль/л | 1,78±0,21 | 1,58±0,15 | 1,77±0,17 | $p > 0,05$ |
| Апо-А, г/л | 1,35±0,29 | 1,30±0,21 | 1,66±0,23 | $p > 0,05$ |
| Апо-В, г/л | 0,83±0,30 | 1,25±0,24** | 0,80±0,20 | $p < 0,05$ |
| ЛП (а), мг/дл | 5,3±1,44 | 17,6±5,21** | 5,2±1,50 | $p < 0,05$ |
| ИЛ-6, нг/л | 1,8±0,84 | 6,26±2,45** | 1,3±0,61 | $p < 0,05$ |
| СРБ, мг/л | 1,6±0,33 | 1,8±0,25 | 1,5±0,20 | $p > 0,05$ |

Примечания:

* n – количество пациентов; m – среднее значение; δ – стандартное отклонение;

** статистически значимые различия с группой здоровых пациентов.



отитом, проходивших хирургическое лечение в РНПЦ оториноларингологии в период с августа по декабрь 2021 года. Данные исследуемых показателей приведены в табл. 2.

Из приведенных в табл. 2 сведений следует, что средние значения содержания общего холестерина, ХС-ЛПВП, ТГ, апо-А и СРБ достоверно не различаются и находятся в пределах референсных величин во всех исследуемых группах ($p > 0,05$).

Концентрация ХС-ЛПНП у пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена (3,30 ммоль/л) по сравнению со значениями показателей лабораторных тестов у пациентов контрольной группы (2,70 ммоль/л, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о нарушении липидного обмена при рецидивировании холестеатомы.

Концентрация ЛП (а) у пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена (17,6 мг/дл) по сравнению с аналогичными значениями у представителей контрольной группы (5,2 мг/дл, $p < 0,05$). Поскольку уровень ЛП (а) предопределяется генетически, можно предположить, что развитие холестеатомы также определяется на молекулярно-генетическом уровне.

Концентрация апо-В у пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена (1,25 г/л) по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (0,80 г/л, $p < 0,05$). Апо-В является функциональным апопротеином ХС-ЛПНП и характеризуется атерогенными свойствами.

Концентрация ИЛ-6 у пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена (6,26 пг/мл) по сравнению с контрольной группой здоровых пациентов (1,3 пг/мл, $p < 0,05$). ИЛ-6 является провоспалительным цитокином, который поддерживает системный и местный воспалительный процесс, с одной стороны, и участвует в нарушении липидного обмена – с другой.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена концентрация ХС-ЛПНП (до 3,30 ммоль/л относительно 2,7 ммоль/л в контрольной группе, $p < 0,05$), апо-В (до 1,25 г/л относительно 0,80 г/л в контрольной группе, $p < 0,05$), ЛП (а) – до 17,6 мг/дл относительно 5,2 мг/дл в контрольной группе, $p < 0,05$).
2. Концентрация ИЛ-6 у пациентов с хроническим эпителиально-антральным гнойным средним отитом с холестеатомой достоверно увеличена (6,26 пг/мл) по сравнению с контрольной группой здоровых пациентов – 1,3 пг/мл ($p < 0,05$).
3. Полученные данные отражают возможную тесную связь между процессами воспалительного характера и возрастанием атерогенного потенциала сыворотки крови – как одного из факторов, обуславливающих нарушения липидного характера, приводящих к формированию холестеатомы.
4. Полученные данные являются основанием к проведению дальнейших исследований на предмет установления лабораторно-диагностической и прогностической значимости выявленных метаболических нарушений.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Krukov A., Luchikhin L., Magomedov M. (2014) *Chronic purulent middle otitis. Clinical recommendations*. Moscow-St. Petersburg, 33 p. (in Russian)
2. Aznauryan A. (2007) *Modern methods of diagnostics of cholesteatoma of middle ear. Autoabstract diss. Ph.M.N.* St. Petersburg, 25 p. (in Russian)
3. Roxana Serban, Cristiana Filip, Luminita Mihaela Radulescu (2021) IL-1 α , IL-6 and IL-8 serum values in patients with chronic suppurative otitis media. *Experimental and therapeutic medicine*, 22 (5): 1226. doi: 10.3892/etm.2021.10660
4. Salikhanova A., Farkhutdinova L. (2013) Immunological features of obesity and their relationship with disorders of carbohydrate and lipid metabolism. *Medical immunology*, vol. 15, no 5, pp. 465–470. (in Russian)
5. Topolanskaya S. (2020) Role of interleukin 6 in aging and growing related diseases. *Clinicist*, vol. 14, pp. 14–21. doi: 10.17650/1818-8338-2020-14-3-4-K-633. (in Russian)
6. Chumakova G., Gritsenko O., Veselovskaya N. (2011) Clinical value of apolipoproteins A and B. *Cardiovascular therapy and prevention*, 10 (6), pp. 105–111. (in Russian)
7. Vasyukova O., Kasyanova Yu., Okorokov P. (2021) Miokines and Adipomyokins: Inflammation Mediators or Unique Molecules of Targeted Obesity Therapy? *Endocrinology problems*, 67 (4), pp. 36–45. (in Russian)
8. Kiskun A. (2019) *Clinical laboratory diagnostics. Training manual – 2nd edition, revised. and additional*. M. GEOTAR-Media, 1000 pp. (in Russian)
9. Kamyshnikov V. (2018) *Laboratory diagnostics in the clinical practice of the doctor. Educational manual*, Minsk, Education and upbringing, 632 pp. (in Russian)
10. Kryukov A., Ivoylov A., Garov E. (2014) Effects of microbial flora on the course of chronic purulent middle otitis. *Medical Council*, 3: 21. (in Russian)
11. Baike E.V., Baike E.E. (2014) Retrospective analysis of microflora of the middle ear in patients with chronic purulent mean otitis in the Trans-Baika region. *Far Eastern Medical Journal*, 3, pp. 68–70. (in Russian)
12. Rahul Mittal, Luca H. Debs, Amit P. Patel (2019) Otopathogenic Staphylococcus aureus Invades Human Middle Ear Epithelial Cells Primarily through Cholesterol Dependent Pathway. *Scientific Reports*, 9: 10777. doi: 10.1038/s41598-019-47079-7
13. Raúl Arcusa, Juan Ángel Carrillo, Raquel Xandri-Martínez (2021) Effects of a Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Status in the Plasma of a Healthy Population: A Placebo-Controlled, Double-Blind, and Randomized Clinical Trial. *Molecules*, vol. 26 (12). doi: 10.3390/molecules26123604
14. Michel R. Langlois, Børge G. Nordestgaard, Anne Langsted (2019) Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 58 (4), pp. 496–517. doi: 10.1515/cclm-2019-1253
15. Viviane Soares, Ivan Silveira de Avelar, Patrícia Espindola Mota Venâncio (2020) Acute Changes in Interleukin-6 Level During Four Days of Long-Distance Walking. *Journal of inflammation research*, 13, pp. 871–878. doi: 10.2147/JIR.S281113



<https://doi.org/10.34883/PL.2022.11.3.007>
УДК 616.15+616-006]:[579.842.1/2-093/098]-053.2



Гурбо Т.О.✉, Кондаурова С.Л.

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

Микробиологический скрининг штаммов Enterobacterales, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор материала, написание текста – Гурбо Т.О.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Кондаурова С.Л.

Подана: 03.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: tantannat@yandex.by

Резюме

Введение. Распространение штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью к антибактериальным лекарственным средствам, является серьезной проблемой в лечении детей с онкогематологическими заболеваниями.

Цель. Анализ распространенности в стационаре энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями.

Материалы и методы. Микробиологический скрининг содержимого желудочно-кишечного тракта детей проводился с целью выявления носительства мультирезистентной микрофлоры. Микробиологическая идентификация энтеробактерий проводилась на основе технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с регистрацией времени пролета (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF), а также на автоматическом анализаторе Vitek 2. Для определения типа карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовался анализатор GeneXpert.

Результаты. Проведен анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, в желудочно-кишечном тракте у пациентов Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии за период с января 2021 г. по апрель 2022 г. Выявлено, что среди штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы (n=24), наибольший удельный вес имела *K. pneumoniae* (87,6%), реже встречались штаммы видов *K. oxytoca* (8,3%) и *E. cloacae* (4,1%). Изучение спектра продуцируемых карбапенемаз энтеробактерий показало, что наибольшим удельным весом обладал тип OXA-48 (50%) (класс D).

Заключение. Для назначения адекватной антибактериальной терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными штаммами энтеробактерий, требуется установление механизмов формирования устойчивости как с использованием фенотипических, так и молекулярно-генетических методов исследования.

Ключевые слова: дети, скрининг, энтеробактерии, карбапенемазы, антибиотикорезистентность

Hurbo T.✉, Kondaurava S.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Microbiological Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Strains in Children with Oncohematological Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: conception and design of the study, material collection, text writing – Hurbo T.; conception and design of the study, editing – Kondaurava S.

Submitted: 03.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: tantannat@yandex.by

Abstract

Introduction. The proliferation of strains of microorganisms resistant to antibacterial drugs is a serious problem in the treatment of children with oncohematological diseases.

Purpose. The aim of our study was to analyze the prevalence of in-hospital carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in children with oncohematologic diseases.

Materials and methods. Microbiological screening of the gastrointestinal contents of children was performed to detect the carrier of multidrug-resistant microflora. Microbiological identification of Enterobacteriaceae was performed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF technology and a Vitek 2 automated analyzer. A GeneXpert real-time polymerase chain reaction (PCR) analyzer was used to determine the type of carbapenemases.

Results. An analysis of the prevalence of Enterobacteriaceae producing carbapenemases in the gastrointestinal tract in patients of the Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology for the period from January 2021 was performed. It was found that among the Enterobacteriaceae producing carbapenemases ($n = 24$), the largest proportion had *K. pneumoniae* (87.6%), less frequent were strains of *K. oxytoca* species (8.3%) and *E. cloacae* (4.1%). The study of the spectrum of Enterobacteriaceae carbapenemases produced showed that the specific gravity of OXA-48 type (50%) (class D) had the greatest share.

Conclusion. For prescription of adequate antibiotic therapy for infections caused by carbapenem-resistant strains of Enterobacteriaceae, it is necessary to determine the mechanisms of resistance formation by means of both phenotypic and molecular genetic methods.

Keywords: children, screening, enterobacteriaceae, carbapenemases, antibiotic resistance

■ ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение штаммов микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы, зачастую приводит к развитию тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных данными микроорганизмами. Пациенты детского возраста с онкогематологической патологией наиболее подвержены развитию инфекционных осложнений



ввиду иммуносупрессивного статуса, вызванного основным заболеванием и проводимой химиотерапией. Носительство определенных штаммов энтеробактерий в желудочно-кишечном тракте таких пациентов может стать причиной транслокации данных микроорганизмов в системный кровоток, вызвав инфекцию, которая очень тяжело поддается терапии. В настоящее время диагностические подходы к возбудителям инфекционных болезней не ограничиваются только определением чувствительности выделенных штаммов энтеробактерий к карбапенемам. Для назначения эффективной этиотропной антибактериальной терапии при лечении тяжелых инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами, необходимо иметь информацию о наличии и типах карбапенемаз, продуцируемых грамотрицательными микроорганизмами, в каждом конкретном случае [1]. Карбапенемазы – ферменты грамотрицательных микроорганизмов, которые гидролизуют бета-лактамы антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы. Продукты карбапенемаз среди бактерий семейства Enterobacteriaceae отличаются от других бактерий с множественной лекарственной устойчивостью тем, что они чувствительны к небольшому количеству антибактериальных средств [2]. Наличие металлобета-лактамаз у микроорганизмов, вызвавших заболевание, обуславливает применение врачами определенных схем антибактериальной терапии, включая комбинированную, с целью эффективной терапии тяжелых инфекционных осложнений у пациентов.

Структурная классификация β -лактамаз учитывает первичную аминокислотную структуру ферментов и пространственную структуру активного центра. Функциональная классификация основана на субстратной специфичности ферментов (способности к преимущественному гидролизу β -лактамов определенных групп – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов). По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса – А, В, С и D [3]. Ферменты классов А, С и D являются гидролазами серинового типа, ферменты класса В – металлодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся один или два атома цинка. Способностью гидролизовать карбапенемы обладают отдельные представители разных молекулярных классов β -лактамаз [4], однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются сериновые карбапенемазы КРС (молекулярный класс А), металло- β -лактамазы – МБЛ (молекулярный класс В) и отдельные сериновые карбапенемазы ОХА (молекулярный класс D) подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58 [5].

Микробиологический скрининг – это проведение исследований в группах пациентов с целью выборочного выделения целевых видов микробов из огромного сообщества микробов. Задачей скрининга является обнаружение возможного возбудителя до развития инфекционного осложнения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, среди пребывающих на лечении в стационаре детей с онкогематологическими заболеваниями.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологический скрининг содержимого желудочно-кишечного тракта пациентов государственного учреждения «Республиканский научно-практический

центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (далее – Центр) проводился путем исследования кала, взятого в контейнер для биологического материала (организация-производитель «Литопласт-МЕД», Республика Беларусь). Материал исследовался группой бактериологии отделения инфекционного контроля Центра. Скрининг АБ-резистентности проводился по двум методам: скринингового выделения энтеробактерий, устойчивых к цефепиму и меропенему. Микробиологический скрининг желудочно-кишечного тракта пациентов на предмет носительства ими мультирезистентной микрофлоры проводился по схеме: первичным пациентам – однократно в течение 72 часов после госпитализации; повторно поступающим пациентам – после межкурсовых промежутков длительностью более 3 месяцев – однократно в течение 72 часов после госпитализации; поступающим переводом из других стационаров – однократно в течение 72 часов после госпитализации; бессимптомным пациентам в период предполагаемой длительной нейтропении (более 7 сут.) – еженедельно в течение всего периода нейтропении; носителям карбапенем-резистентных штаммов энтеробактерий *P. aeruginosa*, *A. baumannii* – еженедельно до получения 2 отрицательных результатов; пациентам отделения анестезиологии и реанимации и отделения трансплантации (ОТ) – еженедельно при нахождении в отделении более 7 суток; лихорадящим пациентам с неустановленным очагом возможной инфекции – однократно в течение 48 часов после появления лихорадки.

Штаммы энтеробактерий, выделенные от пациентов, резистентные к меропенему, исследовались еще и на наличие карбапенемаз. При исследовании использовался тест Cepheid Xpert Carba-R, выполняемый на системе GeneXpert, который представляет собой качественный *in vitro* диагностический тест для быстрого обнаружения и дифференциации нуклеотидных последовательностей генов ^{bla}NDM, ^{bla}VIM, ^{bla}OXA-48, ^{bla}IPM-1, связанных с нечувствительностью к карбапенемам, у грамотрицательных бактерий в образцах, полученных путем ректального соскоба от пациентов, подверженных риску колонизации кишечника бактериями, нечувствительными к карбапенемам. Одновременно выполнялся посев биологического материала с целью выделения микроорганизмов для эпидемиологического типирования, определения чувствительности к антимикробным препаратам и дальнейшей подтверждающей идентификации бактерий, нечувствительных к карбапенемам. Затем культуру, нечувствительную к карбапенемам, инкубированную 24-часа в термостате, смешивали с реактивом и перемешивали содержимое флакона на вихревой мешалке в течение 10 секунд на высокой скорости, после чего переносили 1,7 мл полученного реактива в камеру для пробы картриджа Xpert Carba-R. Подготовленный картридж загружали в прибор GeneXpert не позднее 30 минут после внесения пробы. По окончании исследования в аппарате получали результаты теста Xpert Carba-R Assay и осуществляли интерпретацию результатов исследования.

Микробиологическая идентификация энтеробактерий проводилась на основе технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с регистрацией времени пролета (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF), а также на автоматическом анализаторе Vitek 2 (BioMerieux, Франция). Оценка чувствительности анализируемых штаммов к антибактериальным лекарственным средствам производилась на автоматическом анализаторе Phoenix M50 (Becton Dickinson, США). Полученные цифры минимальных ингибирующих концентраций (МИК) оценивались с использованием системы экспертных правил



Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности – EUCAST. Для определения типа карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовался анализатор GeneXpert (Cepheid, США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

За период с января 2021 г. по апрель 2022 г. из клинического материала (кал) пациентов Центра было выделено 24 штамма полирезистентных энтеробактерий – продуцентов карбапенемаз. Среди энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, наибольший удельный вес имел вид *K. pneumoniae* (87,6% от общего количества), *K. oxytoca* (8,3%), *E. cloacae* (4,1%). Среди выявленных карбапенемаз наиболее часто встречался тип OXA-48 (класс D) – 50%, KPC (класс A) – 4,2%, NDM (класс D) – 33,2%, VIM (класс B) – 4,2%; сочетание NDM и OXA-48 встречалось в 4,2% случаев, сочетание VIM и KPS – в 4,2%. Штаммов, содержащих более 2 типов карбапенемаз, выявлено не было. Результаты исследования штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, представлены в таблице.

Результаты исследования штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, n=24
Results of the study of strains of Enterobacteriaceae producing carbapenemases, n=24

| Штамм | Пациент | Тип карбапенемазы | МИК МЕМ* | Чувствительность к CEF/AVI** | Год |
|----------------------|---------|-------------------|----------|------------------------------|------|
| <i>K. pneumoniae</i> | 1 | KPS | >8 | – | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2 | NDM | ≥16 | – | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 3 | OXA-48 | ≥16 | – | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 4 | OXA-48 | >8 | S*** | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 5 | OXA-48 | >8 | S | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 6 | OXA-48 | – | S | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 7 | OXA-48 | >8 | S | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 8 | NDM, OXA-48 | >8 | R*** | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 9 | OXA-48 | >8 | S | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 10 | OXA-48 | >8 | S | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 11 | NDM | ≥16 | R | 2021 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 12 | OXA-48 | ≥16 | S | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 13 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 14 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 15 | OXA-48 | >8 | S | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 16 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 17 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 18 | OXA-48 | >8 | S | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 19 | OXA-48 | >8 | S | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 20 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 21 | NDM | >8 | R | 2022 |
| <i>K. oxytoca</i> | 22 | VIM, KPS | >8 | R | 2021 |
| <i>K. oxytoca</i> | 23 | VIM | 8 | R | 2021 |
| <i>E. cloacae</i> | 24 | OXA-48 | >8 | S | 2022 |

Примечания: * МЕМ – меропенем; ** CEF/AVI – цефтазидим/авибактам; *** S/R – чувствительность/резистентность.

Штаммы, продуцирующие металлобеталактамазы, демонстрировали устойчивость к цефтазидиму/авибактаму и высокие значения минимальных ингибирующих концентраций меропенема.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии показал, что среди энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы (n=24), наибольший удельный вес имеет *K. pneumoniae* (87,6%), реже встречаются штаммы видов *K. oxytoca* (8,3%) и *E. cloacae* (4,1%). Среди карбапенемаз разных типов преобладает OXA-48 (50%), которая согласно современной молекулярной классификации относится к классу D.

Для разработки алгоритмов назначения эмпирической антибактериальной терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными штаммами энтеробактерий, необходимо располагать сведениями о механизмах формирования устойчивости основных нозокомиальных патогенов к карбапенемам и другим антибактериальным лекарственным средствам как с помощью фенотипических, так и молекулярно-генетических методов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Timofeeva O.G., Polikarpova S.V. Local microbiological monitoring of carbapenemases-producing Enterobacterales. *Laboratory Service*. 2019;8(3):14-19. (in Russian)
2. Falagas M.E., Karageorgopoulos D.E., Nordmann P. Therapeutic options with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol*. 2011; 6:653–6. 10.2217/fmb.11.49.
3. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39:1211–1233b.
4. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007;20:440–458.
5. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gramnegative pathogens: spread and methods of detection. *Medicinskij zhurnal*. 2012;2:10–15. (in Russian)

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.008>
УДК 616.131-005.6-073.48



Чаулин А.М.

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия
Самарский областной клинический кардиологический диспансер, Самара, Россия

Гендерные особенности уровней содержания сердечных тропонинов в сыворотке крови и значимость использования сведений о них в тактике диагностики острого коронарного синдрома (обзор литературы)

Конфликт интересов: не заявлен.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 21.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: alekseymichailovich22976@gmail.com

Резюме

В настоящий период времени в соответствии с рекомендациями ведущих отечественных и зарубежных кардиологических сообществ (Европейского общества кардиологов, Американского общества кардиологов, Американской коллегии кардиологов, Американской ассоциации сердца, Российского общества кардиологов и др.) для диагностики острого коронарного синдрома (ОКС) следует использовать высокочувствительные методы определения сердечных тропонинов. При оценке показателей реализуемых с использованием данных методов лабораторных тестов в качестве верхнего порогового (референтного) значения уровней сердечных тропонинов используется 99-й перцентиль (концентрация тропонинов у 99 из 100 здоровых лиц или пациентов с исключенным ОКС). В ряде выполненных в недавнее время исследований сообщалось, что данный показатель значительно варьирует в зависимости от метода определения уровня сердечных тропонинов и биологических особенностей здоровых индивидуумов, в частности пола, возраста и этнической принадлежности. Тем самым многие исследователи рекомендуют устанавливать значения 99-го перцентиля в соответствии с этими биологическими факторами. Однако по этому поводу существуют и другие мнения, что говорит о необходимости дальнейшего изучения и уточнения биологических вариаций 99-го перцентиля. Кроме того, остаются неизвестными механизмы, лежащие в основе формирования биологических вариаций 99-го перцентиля. В этой статье внимание акцентируется на половых различиях в содержании сердечных тропонинов, возможных механизмах формирования гендерных вариаций пороговых уровней и их потенциальной роли в диагностике ОКС.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, сердечные тропонины, 99-й перцентиль, гендерные особенности

Chaulin A.

Samara State Medical University, Samara, Russia

Samara Regional Clinical Cardiology Dispensary, Samara, Russia

Gender Characteristics of the Levels of Cardiac Troponins in Blood Serum and the Importance of Using Information About them in the Tactics of Diagnosis of Acute Coronary Syndrome (Literature Review)

Conflict of interest: nothing to declare.

Funding: the study had no funding.

Submitted: 21.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: alekseymichailovich22976@gmail.com

Abstract

Currently, in accordance with the recommendations of leading domestic and foreign cardiological communities (the European Society of Cardiology, the American Society of Cardiology, the American College of Cardiology, American Heart Association, the Russian Society of Cardiology, etc.), highly sensitive methods for determining cardiac troponins should be used for the diagnosis of acute coronary syndrome (ACS). When evaluating the indicators implemented using these laboratory test methods, 99 percentile (troponin concentration in 99 out of 100 healthy individuals or patients with excluded ACS) is used as the upper threshold (reference) value of cardiac troponin levels. A number of recent publications have reported that this indicator varies significantly depending on the method of determining the level of cardiac troponins and the biological characteristics of healthy individuals, in particular gender, age and ethnicity. Thus, many researchers recommend setting 99 percentile values in accordance with these biological factors. However, there are other opinions about this, which "speaks" about the need for further study and clarification of biological variations of the 99 percentile. In addition, the mechanisms underlying the formation of biological variations of the 99 percentile remain unknown. In this article, attention is focused on gender differences in the content of cardiac troponins, possible mechanisms for the formation of gender variations in threshold levels and their potential role in the diagnosis of ACS.

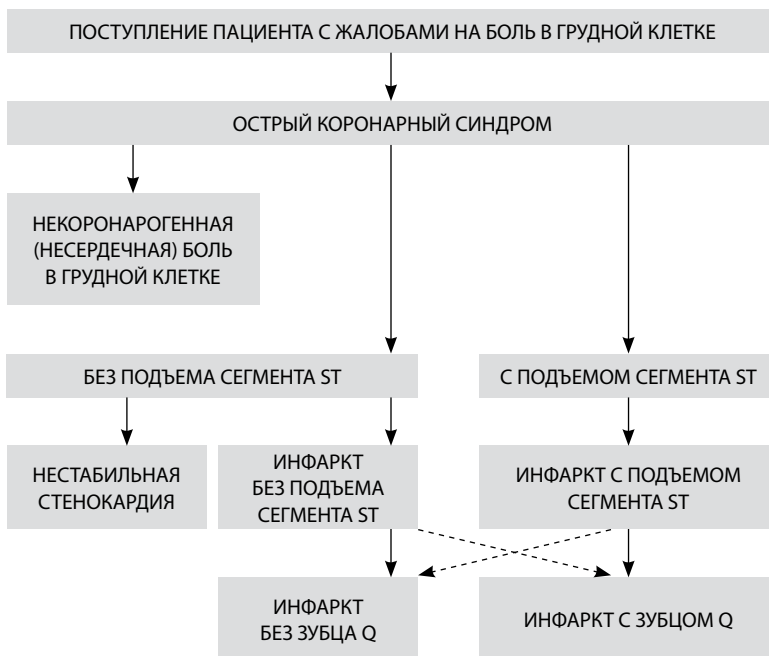
Keywords: acute coronary syndrome, cardiac troponins, 99 percentile, gender characteristics

■ ВВЕДЕНИЕ

Атеросклеротическое поражение коронарных сосудов является морфологическим субстратом основных клинических форм ишемической болезни сердца, для которой в зависимости от ряда условий (образ жизни, применение лекарственных препаратов, наличие сопутствующих заболеваний и других факторов) может быть характерно как стабильное течение (стабильная стенокардия), так и прогрессирование патологического процесса, проявляющееся в виде обострений, которые

принято обозначать термином «острый коронарный синдром» (ОКС). Основным симптомом ОКС является боль или дискомфорт в грудной клетке, которые вынуждают пациента вызвать скорую медицинскую помощь или самостоятельно обратиться в отделение неотложной кардиологии. С точки зрения врача-клинициста, ОКС представляет собой временный («рабочий») диагноз, который необходим для первичной оценки сложившейся ситуации, стратификации риска, выбора тактики лечения у пациентов с обострением ишемической болезни сердца [1]. После проведения дополнительных диагностических манипуляций (электрокардиографии, эхокардиографии, постановки лабораторных тестов, коронарной ангиографии) диагноз ОКС «трансформируется» в следующие клинические формы: нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда без подъема ST, инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, некоронарогенное (несердечное) заболевание (см. рисунок). В последнем случае боль могла быть обусловлена не атеросклерозом коронарных сосудов, а межреберными невралгиями или иррадиацией боли вследствие патологии органов брюшной полости (панкреатит, гастрит и др.) или опорно-двигательного аппарата (остеохондроз).

В соответствии со статистическими данными Всемирной организации здравоохранения, острый коронарный синдром является одной из наиболее опасных форм сердечно-сосудистых патологий и занимает ведущее место в структуре смертности в большинстве стран мира [2]. По данным Евразийской ассоциации кардиологов, наиболее высокие показатели смертности пациентов от ОКС среди европейских стран



**Трансформация диагноза ОКС после обследования пациентов в отделении неотложной помощи
Transformation of ACS diagnosis after examination of patients in the emergency department**

регистрируются в России, Украине, Беларуси, Болгарии и Литве. Среди стран Европы показатель смертности в стационаре составляет от 6 до 14%, тогда как в России смертность составила 18,6% и 17,7% за 2015 год и 2016 год соответственно [1, 3]. У женщин распространенность ОКС ниже, чем у мужчин. Так, доля женщин среди пациентов с ОКС, по данным российского регистра РЕКОРД-3 за 2015 год, составила 39%. Среди пациентов с инфарктом миокарда с подъемом ST и без подъема ST женщины также составляли меньшинство – 32% и 44% соответственно [4].

Поскольку боль в груди может быть первым клиническим признаком ОКС / инфаркта миокарда, ее ранняя констатация связана с улучшением клинических исходов. В то же время быстрое исключение диагноза «инфаркт миокарда» может сократить дорогостоящие госпитализации и предотвратить ненужные, дорогостоящие и потенциально опасные процедуры [5].

Современными отечественными [5, 6] и зарубежными руководящими документами [7] рекомендуется использование тестов определения сердечных тропонинов в качестве «золотого стандарта» для диагностики инфаркта миокарда. Это обусловлено их высокой кардиоспецифичностью (локализацией только в клетках миокарда) [8, 9], диагностической и прогностической ценностью в прогнозировании инфаркта миокарда в острых условиях и риска смертности от всех причин и сердечно-сосудистых событий в общей популяции [10, 11].

Из-за различий в распространенности ОКС и степени повышения уровней сердечных тропонинов у мужчин и женщин на ранних этапах диагностики несколько авторов предложили подход к ранней диагностике ОКС, основанный на половой принадлежности [12, 13]. Однако на сегодняшний день этот подход недостаточно освещается в ряде руководящих документов и отсутствуют конкретные рекомендации по диагностике ОКС в соответствии с гендерной принадлежностью. Во многом это обусловлено противоречивостью результатов клинических исследований, выполненных в данном аспекте. Кроме того, конкретные физиологические механизмы, лежащие в основе формирования гендерных вариаций сывороточных уровней сердечных тропонинов, не установлены.

Целью данного обзора является систематизация информации о значимости учета сведений о гендерных (половых) особенностях содержания (в интервале 99-го перцентиля) сердечных тропонинов в диагностике и прогнозировании развития острого коронарного синдрома, а также о возможных механизмах формирования гендерных различий в уровнях содержания сердечных тропонинов.

■ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ

Комплекс сердечных тропонинов регулирует сокращение поперечнополосатых мышц и состоит из трех субъединиц: тропонина С, Т и I, обозначение которым было присвоено в соответствии с их функциональным значением. Тропонин С (кальций-связывающая субъединица) связывается с ионами кальция, что инициирует конформационные изменения тропонинового комплекса и тропомиозина, приводя к открытию миозин-связывающих сайтов на молекуле актина. Впоследствии с миозин-связывающими сайтами будет взаимодействовать головка миозина, в результате чего образуются поперечные (актин-миозиновые) мостики. Тропонин Т связывается

с тропомиозином, прикрепляя тропониновый комплекс к тонким (актиновым) нитям саркомера. Тропонин I связывается с актином и снижает сродство тропонина С к кальцию, тем самым ингибируя актин-миозиновые взаимодействия [14, 15].

Большая часть сердечного тропонина (примерно 95%) связана с миофиламентами, а небольшая концентрация находится в свободном состоянии в цитозоле. После потери целостности мембран кардиомиоцитов сердца тропонин из цитозоля первоначально высвобождается в сердечный интерстиций, а затем в периферическую кровь. Тропонины Т и I присутствуют в сердечных и скелетных мышцах и кодируются разными генами в каждом типе мышц, что приводит к образованию двух иммунологически различных продуктов. Лабораторно-диагностические исследования основываются на использовании высокоаффинных антител, которые специфичны для сердечного тропонина Т и сердечного тропонина I, а не для тропонина С, поскольку он идентичен в обеих мышцах [15–17].

С тех пор как H. Katus с соавт. описали первый анализ для измерения сердечного тропонина в 1991 году [18], был проделан чрезвычайно долгий путь от разработки до внедрения высокочувствительных анализов тропонина в клиническую практику и в отделение неотложной помощи [19, 20].

Использование высокочувствительных тропониновых лабораторно-диагностических тестов представляет собой важный шаг вперед благодаря их высокой чувствительности к некрозу кардиомиоцитов сердца, поскольку они способны выявлять концентрацию сердечного тропонина примерно в 10–100 раз ниже, чем обычные анализы, что приводит к более точной и своевременной диагностике [21, 22].

Согласно руководящим принципам Международной федерации клинической химии (IFCC) для определения этого нового поколения (высокочувствительных) тропониновых анализов используется два критерия: 1) коэффициент вариации при значении 99-го перцентиля должен составлять 10% или менее (наиболее оптимальные иммунотесты), хотя анализы с погрешностью более 10 и 20% или менее по-прежнему считаются клинически приемлемыми; 2) концентрация сердечных тропонинов должна быть выше минимальной определяемой концентрации (предела детекции) более чем у 50% здоровых индивидуумов [19, 23, 24].

Новые лабораторно-диагностические тесты позволяют проводить более раннюю диагностику и быстро исключать инфаркт миокарда за счет высокой чувствительности [25], однако при этом значительно страдает второй ключевой критерий иммунотеста – специфичность. Клинически это выражается наличием широкого спектра других тропонин-положительных несердечных и сердечных состояний, отличных от инфаркта миокарда [26, 27]. Хотя известны не все механизмы повышения уровня тропонина, в некоторых состояниях это может быть связано с уменьшением поступления кислорода в миокард, и неясно, всегда ли повреждение необратимо, что неизбежно приводит к некрозу миокарда, или все же некоторые заболевания могут вызывать обратимое повреждение. Основные состояния (физиологические и патологические), вызывающие повышение уровней сердечных тропонинов, представлены в табл. 1.

В настоящее время все доступные высокочувствительные методы определения сердечных тропонинов имеют единое диагностическое пороговое значение для диагностики ОКС, основанное на значении 99-го перцентиля, которое рассчитывается

Таблица 1
Основные состояния (физиологические и патологические), вызывающие повышение уровней сердечных тропонинов
Table 1
The main conditions (physiological and pathological) that cause an increase in cardiac troponin levels

| Характер повреждения миокарда | Нозологии |
|--|---|
| Повреждение миокарда, вызванное ишемией | Инфаркт миокарда |
| Повреждение миокарда, не вызванное ишемией при сердечных патологиях | <ul style="list-style-type: none"> ■ миокардит, эндокардит, перимиокардит; ■ применение кардиотоксических препаратов, например, антрациклинов; ■ радиочастотная или криоабляционная терапия; ■ кардиомиопатии и сердечная недостаточность; ■ электрокардиостимуляция или дефибрилляция; ■ инфильтративные патологии сердца, например, амилоидоз |
| Повреждение миокарда, не вызванное ишемией при внесердечных патологиях | <ul style="list-style-type: none"> ■ сепсис; ■ хроническая почечная недостаточность; ■ хроническая обструктивная болезнь легких; ■ тромбоз эмболия легочной артерии; ■ нейрогенные заболевания (инсульт, субарахноидальные кровоизлияния) |
| Физиологические состояния | <ul style="list-style-type: none"> ■ физические нагрузки; ■ стрессовые ситуации |
| Без повреждения миокарда (ложноположительные факторы) | <ul style="list-style-type: none"> ■ гетерофильные антитела; ■ щелочная фосфатаза; ■ гемолиз пробы; ■ ревматоидный фактор; ■ фибриновые сгустки в пробе; ■ кросс-реакция диагностических антител со скелетными тропонинами |

для здоровой популяции [24, 28]. Однако данное пороговое значение может значительно варьировать в зависимости от методологии определения (производителя) сердечных тропонинов [28, 29]. По данным IFCC, основными производителями высокочувствительных иммунохимических наборов реагентов для определения сердечных тропонинов являются: Abbot (США), Beckman Coulter (США), bioMerieux (Франция), ET Healthcare (Китай), LSI Medience (Япония), Fujirebio (Япония), Ortho Clinical Diagnostics (США), Quidel/Alere (США), Roche (Швейцария), Siemens (Германия) и др. (табл. 2).

Дополнительным важным диагностическим преимуществом высокочувствительных тестов иммунохимического определения сердечных тропонинов является возможность выявления повреждений миокарда на субклиническом уровне, что можно использовать для мониторинга и оценки прогноза пациентов, страдающих рядом хронических патологий, среди которых ишемическая болезнь сердца [30], во время лечения онкозаболеваний химиотерапевтическими препаратами, которым свойственна кардиотоксичность [31], а также хроническая обструктивная болезнь легких [32], хроническая болезнь почек [33], сахарный диабет [34], артериальная гипертония [35] и др.

Таблица 2
Основные производители высокочувствительных иммунохимических наборов реагентов для определения сердечных тропонинов [28]
Table 2
The main manufacturers of highly sensitive immunochemical reagent kits for the determination of cardiac troponins [28]

| Производитель/иммунотест | LoD, нг/л | CV, % | Характеристика обследованной здоровой популяции, число, пол, возраст | 99-й перцентиль, нг/мл | Тип исследуемого образца | Процент измеримых значений (выше LoD, но меньше 99-го перцентиля), % |
|---|-----------|---------|--|---|---|--|
| Abbott / Alinity i systems / Alinity i STAT High Sensitive Troponin-I; commercial – OUS | 1,6 | 4,0 | n (21–75 лет) = 1530, в том числе М (21–75 лет) = 764, Ж (21–75 лет) = 766 | Общий = 26,2; для М = 34,2; для Ж = 15,6 | Плазма с антикоагулянтами (гепарином лития, или К ₂ ЭДТА, или К ₃ ЭДТА) или сыворотка | Общий = 85; для М = 92; для Ж = 78 |
| Beckman Coulter / Access 2, Dxl / Access hsTnl; commercial – OUS | 1,0–2,3 | 3,7 | n (21–99 лет) = 1089, в том числе М = 595, Ж = 494 | Общий = 17,5; для М = 19,8; для Ж = 11,6 | Плазма, содержащая гепарин лития | Общий >50, нет данных о гендерных особенностях |
| bioMérieux VIDAS High Sensitive Troponin I; commercial | 3,2 | 7,0 | n (41–80 лет) = 815, в том числе М (41–80 лет) = 447, Ж (41–80 лет) = 368 | Общий = 19,0; для М = 25,0; для Ж = 11,0 | Сыворотка или плазма с антикоагулянтом (гепарин лития) | Данные не предоставлены |
| ET Healthcare Pylon hsTnl assay; China FDA approved | 1,2–1,4 | 10,0 | n (15–91 год) = 863, в том числе М = 425, Ж = 438 | Общий = 27,0; для М = 27,0; для Ж = 21,0 | Плазма с антикоагулянтом (ЭДТА), или сыворотка, или цельная кровь | Общий = 91; для М = 94; для Ж = 89 |
| Fujirebio Lumipulse G G1200 and G600II hsTnl | 2,1 | ≤4,6 | n (18–90 лет) = 1018, в том числе М = 590, Ж = 428 | Общий = 29,6%; для М = 32,8; для Ж = 27,8 | Плазма с антикоагулянтом (гепарин лития) | Общий = 65, нет данных о гендерных особенностях |
| LSI Medience (formerly Mitsubishi) PATHFAST cTnl; commercial | 1,0 | <6,0 | n (18–86 лет) = 474, в том числе М = 238, Ж = 236 | Общий = 15,48; для М = 16,91; для Ж = 11,46 | Плазма с антикоагулянтом (гепарин натрия, или гепарин лития, или ЭДТА) | Общий = 76,3, нет данных о гендерных особенностях |
| Ortho/VITROS / hsTroponin I; commercial | 0,39–0,86 | <10,0 | n (22–91 год) = 952, в том числе М = 466, Ж = 486 | Общий = 11,0; для М = 12,0; для Ж = 9,0 | Сыворотка крови | Общий >50, нет данных о гендерных особенностях |
| Quidel/Alere Triage True hs-cTnl | 0,7–1,6 | 5,0–5,9 | n=789, в том числе М = 398, Ж = 391 | Общий = 20,5; для М = 25,7; для Ж = 14,4 | Плазма крови с антикоагулянтом ЭДТА | Общий ≥50, нет данных о гендерных особенностях |

Окончание таблицы 2

| Производитель/ иммунотест | LoD, нг/л | CV, % | Характеристика обследованной здоровой популяции, число, пол, возраст | 99-й перцентиль, нг/мл | Тип исследуемого образца | Процент измеримых значений (выше LoD, но меньше 99-го перцентиля), % |
|--|-----------|-------|--|--|---|--|
| Roche / cobas e601, e602, E170 / cTnT-hs 18-min; commercial | 2,05 | <10 | n (20–71 год) = 533, в том числе Ж = 49,7% | Общий = 14,0; для М = 16,0; для Ж = 9 | Сыворотка или плазма с антикоагулянтами (ЭДТА, гепарин) | Общий >71,5, нет данных о гендерных особенностях |
| Siemens ATELLICA High-Sensitivity TnI (TnIH), US & OUS; commercial | 1,6 | <4,0 | n (22–91 год) = 2007, в том числе М = 1000, Ж = 1007 | Общий = 45,2; для М = 53,5; для Ж = 34,1 | Сыворотка или плазма с антикоагулянтом (гепарином) | Общий = 71; для М = 84; для Ж = 58 |

Примечания: LoD – предел детекции (минимальная определяемая концентрация); CV – коэффициент вариации; М – мужчины; Ж – женщины; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат. С более полным вариантом таблицы для других тест-систем можно ознакомиться на сайте IFCC [28].

■ ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРОВНЕЙ СЕРДЕЧНЫХ ТРОПОНИНОВ

Гендерные особенности концентраций свойственны целому ряду лабораторных анализов (количество эритроцитов, концентрации гемоглобина, креатинина и др.), что нашло широкое применение в современной клинической практике.

Что касается кардиомаркеров, то впервые сведения о гендерных особенностях показателей лабораторных тестов были обнаружены при исследовании активности креатинкиназы (КК), тест определения которой использовали для диагностики инфаркта миокарда в 60–70-х гг. XX века. Здоровые мужчины имели значительно более высокую активность КК, чем женщины, а темнокожие люди имели более высокую активность КК, чем представители европеоидной расы [36]. Это было характерно также для МВ-фракции креатинкиназы (КК-МВ), причем как для активности (ед/л), так и для концентрации КК-МВ (КК-МВ-масс), измеряемой в нг/мл. Механизм этих различий, по мнению исследователей, был в значительной степени обусловлен различиями в массе скелетных мышц у мужчин по сравнению с женщинами [36]. Позднее гендерные отличия были отмечены и для натрийуретических пептидов, и, по мнению авторов, они были обусловлены разным влиянием мужских и женских половых гормонов на продукцию натрийуретических пептидов в миокарде [37]. Однако с введением в практику первых тестов иммунохимического определения сердечных тропонинов гендерные особенности перестали выявляться, что, вероятно, было связано с низкой чувствительностью этих тест-систем, поскольку они выявляли концентрации тропонинов только 5% здоровых испытуемых [23]. Поэтому в то время господствовало мнение о том, что сердечные тропонины являются строго внутриклеточными молекулами, которые появляются в сыворотке крови только при серьезных патологиях миокарда, а некоторые положительные уровни тропонинов у пациентов с неподтвержденным инфарктом миокарда чаще всего интерпретировались как ложноположительные результаты. Такому мнению также способствовали

исследования, сообщавшие о высокой распространенности ложноположительных результатов сердечных тропонинов у пациентов с рабдомиолизом при патологиях скелетных мышечных тканей [38, 39]. По мере повышения чувствительности лабораторных методов исследования уровни сердечных тропонинов стали выявляться у большего количества здоровых индивидуумов в крови (что позволило рассматривать сердечные тропонины в качестве продуктов метаболизма кардиомиоцитов) и появились первые сообщения о возможных гендерных вариациях уровней сердечных тропонинов. Так, F. Apple с соавт., изучая референтные пределы уровней сердечных тропонинов на крупной выборке пациентов (n=686) при помощи восьми тестов иммунохимического определения, обнаружили наличие гендерных вариаций у 2 методов иммунохимического определения сердечного тропонина I. При этом в среднем уровень тропонина I у мужчин был в 1,2–2,5 раза выше, чем у женщин, по данным непараметрического статистического анализа результатов [40]. Однако это исследование является фактически единственным, в котором сообщалось о гендерных вариациях для умеренно чувствительных методов исследования, в связи с чем это не нашло отражения в практической медицине.

С внедрением высокочувствительных тестов иммунохимического определения было показано, что у 80% здоровых людей обнаруживаемые концентрации сердечных тропонинов превышают предел детекции (предел обнаружения) [41], причем у мужчин показатели были значительно выше, чем у женщин, что привело к более пристальному рассмотрению потенциально возможного 99-го перцентиля, специфичного для пола. В крупном исследовании, включившем 524 здоровых индивидуума (мужчин – 272, женщин – 252), производилось вычисление уровней 99-го перцентиля для 19 тропониновых тестов: один тест на сердечный тропонин T от Roche и 18 анализов на тропонин I от Abbott, Alere, Beckman, bioMerieux, Instrumentation Laboratory, Ortho-Clinical Diagnostics, Singulex, Siemens и Roche, из которых пять по аналитическим характеристикам относились к категории высокочувствительных. По результатам исследования уровни 99-го перцентиля превышали предел детекции у 80% людей у высокочувствительных тестов иммунохимического определения, тогда как при помощи умеренно чувствительных тестов измеряемые уровни тропонинов были обнаружены примерно у 25–30% пациентов. Гендерные особенности 99-го перцентиля были характерны для всех высокочувствительных тест-систем для определения сердечного тропонина I, значения которого у мужчин были в 1,2–2,4 раза выше, чем у женщин. Примерно сходные значения показал высокочувствительный анализ на сердечный тропонин T: 99-й перцентиль для мужчин составил 20 нг/л, а для женщин – 13 нг/л, тогда как общий (независимо от пола) расчетный 99-й перцентиль – 15 нг/л. Кроме того, гендерный 99-й перцентиль был свойственен некоторым умеренно чувствительным тест-системам, по данным которых уровни тропонинов были в 1,3–5 раз выше у мужчин, чем у женщин [41].

Saenger и соавт. [42] показали, что у мужчин и женщин наблюдались статистически значимые различия в концентрациях высокочувствительного тропонина T, при этом предел 99-го перцентиля для мужчин (15,5 нг/л) примерно в 1,7 раза выше, чем для женщин (9,0 нг/л).

В другом крупном исследовании M. Gore с соавт. сообщили об аналогичных результатах трех больших независимых когорт пациентов, в которых были проанализированы концентрации высокочувствительного тропонина T в соответствии со

стратификацией по возрасту, полу и расе. Важно отметить, что более 10% мужчин в возрасте от 65 до 74 лет без сердечно-сосудистых заболеваний имели значения высокочувствительного тропонина Т выше порогового значения (99-го перцентиля) (>14 нг/л). В каждой изученной когорте значение 99-го перцентиля увеличивалось с возрастом старше 60 лет и было выше у мужчин по сравнению с женщинами. Исследователи также обнаружили значительные различия в пороговых уровнях высокочувствительного тропонина Т в зависимости от возрастнo-половых особенностей: мужчины (без учета возраста) = 23 нг/л, мужчины 50–64 лет = 28 нг/мл, мужчины до 50 лет = 19 нг/л; женщины (без учета возраста) = 9 нг/мл, женщины 50–64 лет = 14 нг/мл, женщины до 50 лет = 9 нг/мл [43]. Таким образом, для расчета 99-го перцентиля уровней высокочувствительных тропонинов следует обязательно принимать во внимание пол и возраст. Тогда как использование единого порогового значения (14 нг/л) для высокочувствительного анализа на тропонин Т может привести к гипердиагностике инфаркта миокарда, особенно у мужчин и пожилых людей, поскольку их нормальный (базовый) уровень значительно превышает рекомендуемый производителем иммунотестов 99-й перцентиль. Представленные исследования свидетельствуют о необходимости пристального изучения гендерно-возрастных особенностей тропонинов для клинической валидации.

В действующем руководстве Европейского общества кардиологов (ESC) по диагностике и лечению инфаркта миокарда без подъема сегмента ST [44] постановка диагноза «инфаркт миокарда» основывается не на одном значении сердечного тропонина, а на двух основных алгоритмах, основанных на динамических изменениях сТn в момент 0 (при поступлении в отделение неотложной помощи и первом анализе крови) и через 3 часа или через 1 час. Для применения данных алгоритмов следует использовать только проверенные высокочувствительные тропониновые иммунотесты с подтвержденными пороговыми уровнями или значениями отсечки. Примечательно, что в алгоритме 0/3 ч указана четкая ссылка на верхний контрольный предел 99-го перцентиля, и это также указано в четвертом универсальном определении инфаркта миокарда [7], в то время как в алгоритме 0/1 ч используемые отсечки ниже 99-го перцентиля и также рассчитаны для конкретных тропониновых тестов иммунохимического определения. Наиболее важную роль в этих алгоритмах диагностики играет кинетика повышения уровней сердечных тропонинов в течение первых часов от момента болей в груди / поступления в отделение неотложной помощи. Положительная прогностическая ценность этих алгоритмов для пациентов с инфарктом миокарда, т. е. тех, которые соответствуют критериям «rule-in», составляет 75–80%. Некоторые пациенты, которые соответствуют критерию «rule-in» с диагнозами, отличными от инфаркта миокарда, могут страдать теми патологическими состояниями (например, кардиомиопатия такоцубо, миокардит и др.), которые обычно требуют госпитализации и проведения коронарной ангиографии для точной диагностики [44]. В связи с тем что верхний контрольный предел 99-го перцентиля не всегда зависит от пола, а алгоритм 0/1 ч не использует пороговые значения, зависящие от пола, отсутствие специфичности и относительно низкая положительная прогностическая ценность сердечных тропонинов у пациентов с инфарктом миокарда могут быть частично объяснены неадекватным пороговым значением, равным как для мужчин, так и для женщин.

Продолжаются дебаты относительно целесообразности использования 99-го перцентиля, зависящего от пола, в качестве диагностического порога [23, 44–48]. Его применение может привести к избытку пациентов с повышением уровня сердечных тропонинов, которое не связано с инфарктом миокарда [45, 46]. С другой стороны, использование общих отсечек может привести к недооценке инфаркта миокарда, особенно у женщин [47, 48]. V. Novack и соавт. [49] показали, что женщины представляют собой группу высокого риска, которая получает меньше рекомендованных руководством методов лечения в условиях инфаркта миокарда, включая менее частую катетеризацию сердца и использование методов вторичной профилактики. Поэтому определение порогового уровня сердечного тропонина у женщин имеет решающее значение, поскольку неправильный предел принятия решения может привести к неправильной интерпретации результата и дальнейшей тактике ведения данных пациентов.

В ретроспективном исследовании, проведенном C. Trambas et al. [50], переход от умеренно чувствительного метода определения тропонина I к высокочувствительному анализу на тропонин I значительно увеличил число пациенток с повышенной концентрацией тропонина I, в то время как у мужчин статистически значимых изменений не было обнаружено. Введение пороговых референтных величин по половой принадлежности не привело к увеличению числа случаев инфаркта миокарда среди женского населения. С другой стороны, введение референтных интервалов, зависящих от пола, выявило тех женщин, которые подвергаются повышенному риску будущих сердечно-сосудистых событий. Аналогичные результаты были продемонстрированы и при использовании высокочувствительного тропонина T в исследовании (исследование реваскуляризации шунтирующей ангиопластики при сахарном диабете 2-го типа) [51]. В данном исследовании наблюдались 684 женщины и 1601 мужчина с сахарным диабетом 2-го типа и стабильной ишемической болезнью сердца в течение 5 лет. Результаты показали, что среди пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и стабильной ишемической болезнью сердца женщины с циркулирующими концентрациями высокочувствительного тропонина T, которые находятся в пределах «нормального» диапазона (стандартно используемого 99-го перцентиля без учета половой принадлежности), подвергаются повышенному риску серьезных сердечно-сосудистых событий, что превышает показатели, наблюдаемые среди мужчин с аналогичными концентрациями высокочувствительного тропонина T [51]. Тем самым это исследование также свидетельствует о необходимости пересмотра 99-го перцентиля с учетом гендерной принадлежности.

Возможные механизмы формирования гендерных особенностей сердечных тропонинов

В физиологических условиях наиболее частыми причинами повышения сердечных тропонинов являются физические нагрузки и психоэмоциональные стрессы [52–54]. Данные физиологические состояния могут приводить к перегрузке миокарда, маломасштабным процессам апоптоза кардиомиоцитов вследствие повышения активности симпатoadреналовой системы, повышению активности прооксидантных механизмов, обратимому повреждению клеточных мембран кардиомиоцитов,

что сопровождается высвобождением цитозольных молекул тропонинов, и небольшому повышению сывороточных концентраций сердечных тропонинов [55–57]. Таким образом, повышенный уровень тропонинов у здоровых индивидуумов может отражать реакцию клеток миокарда на влияние стрессовых факторов. Однако у мужчин и женщин активность протективных механизмов разных клеток, в том числе миокарда, против стрессовых факторов различается, что и может быть возможным объяснением гендерных различий в сывороточных уровнях сердечных тропонинов. Так, в недавнем исследовании [58] было продемонстрировано, что уровни сердечного тропонина Т после одинаковой физической нагрузки у спортсменов мужского пола были значительно выше, чем у спортсменок, что свидетельствует о разной реакции сердечных миоцитов на физическую нагрузку у мужчин и женщин. В дополнение к этому в исследовании N. Tiller с соавт. также отметили более выраженные нарушения физиологии сердечно-сосудистой системы у мужчин, чем у женщин, после ультрамарафона [59]. Потенциально данные негативные эффекты могли привести к большему высвобождению сердечных тропонинов у мужчин, по сравнению с лицами женского пола.

Тот факт, что мужчины менее защищены от повреждения миокарда, был также продемонстрирован в исследовании, в котором после операции на сердце у мужчин наблюдалось большее повышение уровня тропонина в сыворотке крови, чем у женщин [60]. Причем группы мужчин и женщин были составлены в соответствии с одинаковыми характеристиками (одинаковый индекс массы тела, продолжительность искусственного кровообращения, время пережатия аорты во время операции и др.), которые потенциально могли бы повлиять на степень повреждения миокарда и высвобождения сердечных тропонинов. Тем самым вариации повреждения и высвобождения сердечных тропонинов, по всей видимости, обусловлены именно гендерными различиями в степени ишемическо-реперфузионного повреждения кардиомиоцитов.

Гендерные различия в степени повреждения миокарда могут быть объяснены гендерными особенностями в уровнях ряда биологически активных молекул, и в частности половых стероидов. Так, у женщин уровни эстрогенов значительно выше, чем у мужчин, у которых преобладающим стероидом является тестостерон. Причем для эстрогенов, в отличие от тестостерона, характерны многочисленные кардиопротективные эффекты. Так, было показано, что эстрогены могут оказывать защитное действие против окислительного повреждения клеток, уменьшая окислительное повреждение и стимулируя экспрессию антиоксидантных ферментов [61, 62]. Кроме того, эстрогены усиливают экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота, что приводит к увеличению образования одного из мощных вазодилататоров – оксида азота, а это в свою очередь способствует большей устойчивости сердечно-сосудистой системы к спазмам коронарных сосудов (и, соответственно, снижению кровенаполнения миокарда), возникающим на фоне психоэмоциональных стрессов. Поскольку с возрастом у женщин выработка эстрогенов снижается, то уменьшаются и кардиопротективные эффекты, что выражается более высокими уровнями сердечных тропонинов у женщин пожилого возраста [43], о чем ранее сообщалось в предыдущем разделе. Таким образом, кардиопротективные эффекты эстрогенов могут нивелировать степень повреждения кардиомиоцитов как при физиологических условиях (в условиях стресса), так и при патологических состояниях.

Другим физиологическим механизмом высвобождения сердечных тропонинов считается метаболизм и обновления сердечных миоцитов [14, 63–65], который ответственен за формирование базовых сывороточных уровней сердечных тропонинов. Принимая во внимание тот факт, что гипертрофия миокарда ассоциирована с уровнями сердечных тропонинов у здоровых лиц [10, 66, 67], а у мужчин масса миокарда (физиологическая гипертрофия) больше, чем у женщин [43, 48], метаболизм и обновление кардиомиоцитов также можно рассматривать в качестве возможного механизма, который объясняет гендерные вариации сывороточных уровней сердечных тропонинов. Кроме того, этот механизм также может объяснить гендерные различия в уровнях КК и КК-МВ, продемонстрированные в клинических исследованиях [68–70].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, внедрение в клиническую практику высокочувствительных иммунохимических тестов определения тропонинов требует рассмотрения ряда биологических факторов индивидуумов, включая гендерные и возрастные особенности. Оптимальный уровень 99-го перцентиля имеет большое значение для своевременной диагностики острого коронарного синдрома и в то же время предупреждает гипердиагностику инфаркта миокарда. Так, в ряде исследований было показано, что использование общего 99-го перцентиля может приводить к гиподиагностике острого коронарного синдрома у женщин, поскольку их физиологические уровни сердечных тропонинов значительно меньше. В то же время использование 99-го перцентиля без учета гендерного фактора приводит к гипердиагностике острого коронарного синдрома у мужчин, что обусловлено более высокими физиологическими уровнями сердечных тропонинов в крови. По данным IFCC, гендерные особенности 99-го перцентиля свойственны большинству существующих высокочувствительных тропониновых лабораторных тестов. Возможными механизмами, лежащими в основе гендерных вариаций уровней сердечных тропонинов, являются эффекты половых гормонов и различия в массе миокарда. Так, эстрогены обладают кардиозащитными эффектами, благодаря которым они вызывают расширение коронарных сосудов, что повышает устойчивость кардиомиоцитов к физическим нагрузкам и стрессовым ситуациям. В дополнение к этому эстрогены уменьшают оксидативный стресс, благодаря чему ограничивается повреждение клеточных мембран и подавляются апоптотические механизмы. Комплексные кардиопротекторные эффекты эстрогенов, по всей видимости, ограничивают высвобождение цитоплазматических молекул сердечных тропонинов из кардиомиоцита в кровоток. Необходимы дальнейшие исследования гендерных особенностей уровней сердечных тропонинов: как клинического характера (для уточнения их значимости в алгоритмах диагностики острого коронарного синдрома), так и фундаментального характера (для уточнения молекулярных механизмов, лежащих в основе гендерных вариаций «сывороточных» уровней тропонинов).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Staroverov I.I., Shakhnovich R.M., Gilyarov M.Yu. EURASIAN CLINICAL GUIDELINES ON DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ACUTE CORONARY SYNDROME WITH ST SEGMENT ELEVATION (STEMI). *Eurasian heart journal*. 2020;1:4–77. Available at: <https://doi.org/10.38109/2225-1685-2020-1-4-77>. (in Russian)
2. Collet J.P., Thiele H., Barbato E.; ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289–1367. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa575
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117–71. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2
4. Erikh A.D., Gratsiansky On Behalf Of Record-Participants NA. Registry of Acute Coronary Syndromes RECORD-3. Characteristics of Patients and Treatment During Initial Hospitalization. *Kardiologija*. 2016;56(4):16–24. (in Russian)
5. 2020 Clinical practice guidelines for Acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(11):4103. doi: 10.15829/1560-4071-2020-4103. (in Russian)
6. Barbarash O.L., Duplyakov D.V., Zateichikov D.A. 2020 Clinical practice guidelines for Acute coronary syndrome without ST segment elevation. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(4):4449. doi: 10.15829/1560-4071-2021-4449. (in Russian)
7. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC) / American College of Cardiology (ACC) / American Heart Association (AHA) / World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618–e651.
8. Kuzmenko A. Cardiospecific markers in the diagnosis of myocardial infarction. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2012;2:122–129. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=17880435>. (in Russian)
9. Chaulin A. Cardiac Troponins: Contemporary Biological Data and New Methods of Determination. *Vasc Health Risk Manag*. 2021;17:299–316. doi: 10.2147/VHRM.S300002
10. de Lemos J.A., Drazner M.H., Omland T. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA*. 2010;304(22):2503–12. doi: 10.1001/jama.2010.1768
11. Zeller T., Tunstall-Pedoe H., Saarela O.; MORGAM Investigators. High population prevalence of cardiac troponin I measured by a high-sensitivity assay and cardiovascular risk estimation: the MORGAM Biomarker Project Scottish Cohort. *Eur Heart J*. 2014;35(5):271–81. doi: 10.1093/eurheartj/eh406
12. Lobo R., De Michieli L., Jaffe A.S. Sex-Specific 99th Percentile URLs for Cardiac Troponin Assays-Their Time Has Come. *Clin Chem*. 2021;67(1):197–200. doi: 10.1093/clinchem/hvaa204
13. Peacock W.F., Baumann B.M., Rivers E.J. Using Sex-specific Cutoffs for High-sensitivity Cardiac Troponin T to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Acad Emerg Med*. 2021;28(4):463–466. doi: 10.1111/acem.14098
14. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Analytical review of modern information on the physiological and pathochemical mechanisms of the release of cardiospecific proteins from muscle tissue, methodology and technologies of their research, interpretation of the results. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2022;11(1):78–97. doi: 10.34883/PL.2022.11.1.018. (in Russian)
15. Kuzmenko A., Kamynshnikov V. *Laboratory diagnostics of acute myocardial infarction*. Aduksatsia. 2009;72 p. (in Russian)
16. Xu R.Y., Zhu X.F., Yang Y., Ye P. High-sensitive cardiac troponin T. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10(1):102–9. doi: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.01.015
17. Chaulin A.M. Cardiac troponins: current information on the main analytical characteristics of determination methods and new diagnostic possibilities. *Medwave*. 2021;10;21(11):e8498.
18. Katus H.A., Remppis A., Neumann F.J. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1991;83(3):902–12. doi: 10.1161/01.cir.83.3.902
19. Chaulin A.M., Abashina O.E., Duplyakov D.V. High-sensitivity cardiac troponins: detection and central analytical characteristics. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(2):2590. Available at: <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-2590>. (in Russian)
20. Galvani M., Bachetti C. High-sensitivity troponin in emergency room practice: pros and cons. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2018;19 Suppl 1:e68–e71. doi: 10.2459/JCM.0000000000000604
21. Jaffe A.S. The 10 commandments of troponin, with special reference to high sensitivity assays. *Heart*. 2011;97:940–946.
22. Chaulin A.M., Karslyan L.S., Bazyuk E.V. Clinical and Diagnostic Value of Cardiac Markers in Human Biological Fluids. *Kardiologija*. 2019;59(11):66–75. Available at: <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.11.1.414>. (in Russian)
23. Apple F.S., Collinson P.O.; IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem*. 2012;58(1):54–61. doi: 10.1373/clinchem.2011.165795
24. Apple F.S., Jaffe A.S., Collinson P.; International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem*. 2015; 48(4–5):201–3. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.08.021
25. Reichlin T., Hochholzer W., Bassetti S. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med*. 2009;361(9):858–67. doi: 10.1056/NEJMoa0900428
26. Chaulin A.M. Elevation Mechanisms and Diagnostic Consideration of Cardiac Troponins under Conditions Not Associated with Myocardial Infarction. Part 1. *Life (Basel)*. 2021;11(9):914. doi: 10.3390/life11090914
27. Chaulin A.M. Elevation Mechanisms and Diagnostic Consideration of Cardiac Troponins under Conditions Not Associated with Myocardial Infarction. Part 2. *Life (Basel)*. 2021;11(11):1175. doi: 10.3390/life11111175
28. Available at: <https://www.ifcc.org/media/478962/high-sensitivity-cardiac-troponin-i-and-t-assay-analytical-characteristics-designated-by-manufacturer-v042021.pdf>
29. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Cardiac troponins: Current data on the diagnostic value and analytical characteristics of new determination methods. *Cor Vasa*. 2021;63:486–493. doi: 10.33678/cor.2021.041
30. Mohebi R., Jackson L., McCarthy C.P. Relation of High-Sensitivity Cardiac Troponin I and Obstructive Coronary Artery Disease in Patients Without Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2022;173:16–24. doi: 10.1016/j.amjcard.2022.03.001
31. Chaulin A.M., Abashina O.E., Duplyakov D.V. Pathophysiological mechanisms of cardiotoxicity in chemotherapeutic agents. *Russ. Open Med. J*. 2020;9(3):e0305. doi: 10.15275/rusomj.2020.0305
32. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(3):2539. Available at: <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-2539>. (in Russian)

33. Hti Lar Seng N.S., Zeratsion G., Pena O. Utility of Cardiac Troponins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Cardiol Rev.* 2022. doi: 10.1097/CRD.0000000000000461
34. Bellia C., Lombardo M., Della-Morte D. Use of Troponin as a predictor for cardiovascular diseases in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Chim Acta.* 2020;507:54–61. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.007
35. Chaulin A., Duplyakov D. Modern ideas about the diagnostic significance and mechanisms of increasing the levels of cardiac troponins in arterial hypertension in human biological fluids. *Cardiology in Belarus.* 2022;14(1):80–94. doi: <https://doi.org/10.34883/Pl.2022.14.1.008>
36. Apple F.S., Jaffe A.S. Men are different than women: it's true for cardiac troponin too. *Clin Biochem.* 2014;47(10-11):867–8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.06.008
37. Apple F.S., Panteghini M., Ravkilde J.; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin Chem.* 2005;51(3):486–93. doi: 10.1373/clinchem.2004.044594
38. Punukollu G., Gowda R.M., Khan I.A. Elevated serum cardiac troponin I in rhabdomyolysis. *Int J Cardiol.* 2004;96(1):35–40. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.04.053
39. Li S.F., Zapata J., Tillem E. The prevalence of false-positive cardiac troponin I in ED patients with rhabdomyolysis. *Am J Emerg Med.* 2005;23(7):860–3. doi: 10.1016/j.ajem.2005.05.008
40. Apple F.S., Quist H.E., Doyle P.J. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem.* 2003;49(8):1331–6. doi: 10.1373/49.8.1331
41. Apple F.S., Ler R., Murakami M.M. Determination of 19 cardiac troponin I and T assay 99th percentile values from a common presumably healthy population. *Clin Chem.* 2012;58(11):1574–81. doi: 10.1373/clinchem.2012.192716
42. Saenger A.K., Beyrau R., Braun S. Multicenter analytical evaluation of a high-sensitivity troponin T assay. *Clin Chim Acta.* 2011;412(9-10):748–54. doi: 10.1016/j.cca.2010.12.034
43. Gore M.O., Seliger S.L., Defilippi C.R. Age- and sex-dependent upper reference limits for the high-sensitivity cardiac troponin T assay. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(14):1441–8. doi: 10.1016/j.jacc.2013.12.032
44. Roffi M., Patrono C., Collet J.P.; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37(3):267–315. doi: 10.1093/eurheartj/ehv320
45. Mueller-Hennesen M., Lindahl B., Giannitsis E.; TRAPID-AMI Investigators. Diagnostic and prognostic implications using age- and gender-specific cut-offs for high-sensitivity cardiac troponin T – Sub-analysis from the TRAPID-AMI study. *Int J Cardiol.* 2016;209:26–33. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.01.213
46. Rubini Giménez M., Twerenbold R., Boeddinghaus J. Clinical Effect of Sex-Specific Cutoff Values of High-Sensitivity Cardiac Troponin T in Suspected Myocardial Infarction. *JAMA Cardiol.* 2016;1(8):912–920. doi: 10.1001/jamacardio.2016.2882
47. McRae A., Graham M., Abedin T. Sex-specific, high-sensitivity cardiac troponin T cut-off concentrations for ruling out acute myocardial infarction with a single measurement. *CJEM.* 2019;21(1):26–33. doi: 10.1017/cem.2018.435
48. Shah A.S., Griffiths M., Lee K.K. High sensitivity cardiac troponin and the under-diagnosis of myocardial infarction in women: prospective cohort study. *BMJ.* 2015;350:g7873. doi: 10.1136/bmj.g7873
49. Novack V., Cutlip D.E., Jotkowitz A. Reduction in sex-based mortality difference with implementation of new cardiology guidelines. *Am J Med.* 2008;121(7):597–603.e1. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.01.041
50. Trambas C., Pickering J.W., Than M. Impact of High-Sensitivity Troponin I Testing with Sex-Specific Cutoffs on the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem.* 2016;62(6):831–8. doi: 10.1373/clinchem.2015.252569
51. Everett B.M., Brooks M.M., Vlachos H.E.; BARI 2D Study Group. Sex Differences in Cardiac Troponin and the Risk of Death or Major Cardiovascular Events. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(9):978–80. doi: 10.1016/j.jacc.2016.06.013
52. Lazzarino A.I., Hamer M., Gaze D. The association between cortisol response to mental stress and high-sensitivity cardiac troponin T plasma concentration in healthy adults. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(18):1694–1701. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.070
53. Aengevaeren V.L., Baggish A.L., Chung E.H. Exercise-Induced Cardiac Troponin Elevations: From Underlying Mechanisms to Clinical Relevance. *Circulation.* 2021;144(24):1955–1972. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056208
54. Chaulin A.M., Duplyakova P.D., Duplyakov D.V. Circadian rhythms of cardiac troponins: mechanisms and clinical significance. *Russian Journal of Cardiology.* 2020;25(35):4061. Available at: <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4061>
55. Jan M.I., Khan R.A., Fozia, Ahmad I. C-Reactive Protein and High-Sensitive Cardiac Troponins Correlate with Oxidative Stress in Valvular Heart Disease Patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:5029853. doi: 10.1155/2022/5029853
56. Chaulin A.M. Phosphorylation and Fragmentation of the Cardiac Troponin T: Mechanisms, Role in Pathophysiology and Laboratory Diagnosis. *Int J Biomed.* 2021;11:250–259. doi: 10.21103/Article11(3)_RA2
57. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Arrhythmogenic effects of doxorubicin. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020;9(3):69–80. Available at: <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2020-9-3-69-80>. (in Russian)
58. Kong Z., Nie J., Lin H. Sex differences in release of cardiac troponin T after endurance exercise. *Biomarkers.* 2017;22(3-4):345–350. doi: 10.1080/1354750X.2016.1265007
59. Tiller N.B., Wheatley-Guy C.M., Fermoye C.C. Sex-specific Physiological Responses to Ultramarathon. *Med Sci Sports Exerc.* 2022. doi: 10.1249/MSS.0000000000002962
60. Schwarzenberger J.C., Sun L.S., Pesce M.A. Sex-based differences in serum cardiac troponin I, a specific marker for myocardial injury, after cardiac surgery. *Crit Care Med.* 2003;31(3):689–93. doi: 10.1097/01.CCM.0000055442.84685.4D
61. Mendelsohn M.E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol.* 2002;89(12A):12E–17E; discussion 17E–18E. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02405-0
62. Stearns J.D., Dávila-Román V.G., Barzilai B. Prognostic value of troponin I levels for predicting adverse cardiovascular outcomes in postmenopausal women undergoing cardiac surgery. *Anesth Analg.* 2009;108(3):719–26. doi: 10.1213/ane.0b013e318193fe73
63. Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324(5923):98–102. doi: 10.1126/science.1164680
64. White H.D. Pathobiology of troponin elevations: do elevations occur with myocardial ischemia as well as necrosis? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(24):2406–8. doi: 10.1016/j.jacc.2011.01.029
65. Chaulin A.M. Main analytical characteristics of laboratory methods for the determination of cardiac troponins: a review from the historical and modern points of view. *Orv Hetil.* 2022;163(1):12–20. doi: 10.1556/650.2021.32296

66. Uçar H., Gür M., Kivrak A. High-sensitivity cardiac troponin T levels in newly diagnosed hypertensive patients with different left ventricle geometry. *Blood Press.* 2014;23(4):240–7. doi: 10.3109/08037051.2013.840429
67. Chaulin A.M. Updated information about methods of identification and diagnostic opportunities of cardiac troponins. *Riv Ital Della Med Lab.* 2021;17:154–164. doi: 10.23736/S1825-859X.21.00116-X
68. Neal R.C., Ferdinand K.C., Ycas J., Miller E. Relationship of ethnic origin, gender, and age to blood creatine kinase levels. *Am J Med.* 2009;122(1):73–8. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.08.033
69. Clifford S.M., Bunker A.M., Jacobsen J.R., Roberts W.L. Age and gender specific pediatric reference intervals for aldolase, amylase, ceruloplasmin, creatine kinase, pancreatic amylase, prealbumin, and uric acid. *Clin Chim Acta.* 2011;412(9–10):788–90. doi: 10.1016/j.cca.2011.01.011
70. Zaninotto M., Mion M.M., Novello E. Creatine-kinase MB mass: age and sex-associated reference limits in two different platforms that use the same method. *Clin Chim Acta.* 2009;401(1-2):162–4. doi: 10.1016/j.cca.2008.12.003

<https://doi.org/10.34883/Pl.2022.11.3.009>
УДК 577.1:612.111



Пыко К.В.✉, Беспалов Ю.А., Осочук С.С.
Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Роль сиаловых кислот и ζ -потенциала эритроцитов в осуществлении транспорта кислорода из русла крови в жизненно важные органы и ткани: обзор современных данных

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: написание текста – Пыко К.В., Беспалов Ю.А.; редактирование текста – Осочук С.С.

Подана: 22.05.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: pykokiril@gmail.com

Резюме

Транспорт кислорода из русла крови в ткани жизненно важных органов является одним из наиболее важных факторов обеспечения энергетического баланса организма. При нарушении его развиваются изменения метаболизма и физиологического состояния организма, проявляющиеся в диапазоне от ощущения недомогания до летального исхода, что связано прежде всего с недостаточным потреблением тканями организма кислорода как конечного акцептора электрон-транспортной цепи митохондрий. Понимание и углубленное изучение этих механизмов может значительно повлиять на существующие подходы к лечению пациентов, подготовке спортсменов и разработке технологий двойного назначения, в том числе для военизированных подразделений. Одними из недостаточно полно изученных участников транспорта кислорода и энергообеспечения клеток являются сиаловые кислоты и формируемый ими ζ -потенциал эритроцитов.

В обзоре рассмотрены и обобщены современные знания о синтезе, биодegradации сиаловых кислот, их роли в посттрансляционной модификации белков, клеточных и субклеточных структур, транспорте кислорода, энергопродукции и развитии в ряде случаев не совместимых с жизнью заболеваний. Представленные данные литературы являются основой для проведения экспериментальных исследований, которые могут помочь уточнить механизмы транспорта кислорода.

Ключевые слова: дзета-потенциал, сиаловые кислоты, N-ацетилнейраминовая кислота, N-гликолилнейраминовая кислота, транспорт кислорода

Pyko K. ✉, Bepalov Yu., Osochuk S.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

The Role of Sialic Acid and Red Blood Cells Zeta Potential in Oxygen Transport from Bloodstream to Vital Organs and Tissues: Review of Current Data

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: text writing – Pyko K., Bepalov Yu.; text editing – Osochuk S.

Submitted: 22.05.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: pykokiril@gmail.com

Abstract

Oxygen transport from bloodstream to tissues is an important goal in maintaining the energy balance of the body. If this balance undergoes an extreme change, it could lead to number of pathological condition from fatigue to death because tissue has lack of oxygen as the final acceptor of the electron transport chain in the mitochondria. Understanding and researching these mechanisms could bring important changes in modern treatment guidelines, athletic training or military training and invention of dual-use technology. One of the unknown factors that has an impact on oxygen delivery is sialic acid and zeta-potential.

This review examines and summarizes the current knowledge about the synthesis, biodegradation of sialic acids and the role in posttranslational modification of proteins, modification of cellular and subcellular structures, oxygen delivery, bioenergetics, organism development and how they influence the mortality rates of some diseases. The data presented are the basis for conducting experimental studies that can help to understand the mechanism of oxygen transport.

Keywords: zeta-potential, sialic acid, N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid, oxygen transport

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хорошо известно, что основным энергетическим источником, обеспечивающим метаболические процессы биологических систем, является аденозинтрифосфат (АТФ). Прекращение продукции АТФ равнозначно смерти организма, а снижение ведет к развитию гипоэнергетических состояний в диапазоне от снижения работоспособности до выраженной полиорганной недостаточности. У животных и человека существует два способа продукции АТФ – субстратное и окислительное фосфорилирование [1]. При этом первый путь (субстратное фосфорилирование) менее эффективен, чем второй. В расчете на одну молекулу глюкозы в ходе субстратного фосфорилирования образуется 4 молекулы АТФ, а в ходе окислительного фосфорилирования (с учетом 3 стадий субстратного фосфорилирования) – 38 молекул АТФ. Для нормального протекания процессов окислительного фосфорилирования

необходимо достаточное количество кислорода. Именно этот факт в первую очередь определяет важность доставки кислорода в ткани.

Основным поставщиком кислорода в ткани является эритроцит. Процесс отдачи кислорода от эритроцита тканям является сложным и многоуровневым, а нарушение любого из его регуляторных звеньев способно привести к снижению активности транспорта кислорода в ткани, уменьшению продукции АТФ и увеличению количества кислорода в венозной крови [2], причем степень артериализации венозной крови коррелирует с тяжестью заболевания [3]. Одним из участников процесса переноса кислорода в ткани является отрицательный заряд эритроцитов – так называемый дзета-потенциал (ζ -потенциал), формирующийся за счет сиаловых кислот (СК), входящих в состав гликопротеинов: гликофоринов А, В, С, D, белка полосы 3 [4, 5].

■ СИАЛОВЫЕ КИСЛОТЫ

Сиаловые кислоты – это семейство соединений – производных нейраминовой кислоты, замещенных по N и O ацетильной, лактильной, метильной, сульфатной и фосфатной группами, что в итоге создает около 50 их отдельных форм. В организме человека наибольшее распространение получили два представителя сиаловых кислот – N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac) (рис. 1A) и N-гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc) (рис. 1B). При этом в человеческой популяции способность к биосинтезу N-гликолилнейраминовой кислоты утрачена, а обнаруживаемая в составе сиаловых кислот N-гликолилнейраминовая кислота имеет пищевое происхождение [6].

Важно отметить, что дополнительная гидроксильная группа в составе Neu5Gc изменяет ее рКа [7], делая молекулу более гидрофильной и более отрицательно заряженной по сравнению с Neu5Ac [8]. Тем самым изменение концентрации Neu5Gc способно оказать влияние на величину ζ -потенциала. Кроме того, Neu5Gc более устойчива к действию сиалидаз [9], с чем связывают ее токсичность в отношении головного мозга и утрату способности синтезироваться в организме позвоночных [8]. С другой стороны, известно, что стареющие эритроциты содержат на 10–15% меньшее количество сиаловых кислот, чем молодые эритроциты [10], а меньшая подверженность Neu5Gc действию сиалидаз, вероятно, способна увеличить продолжительность сохранения СК в составе эритроцита и, как следствие, его ζ -потенциала и длительности

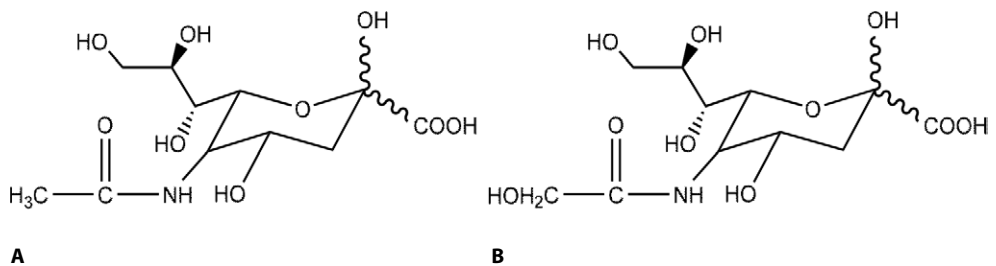


Рис. 1. Структура сиаловых кислот
Fig. 1. Sialic acid structure

циркуляции в крови. Возможно, в том числе и эта особенность лежит в основе наблюдавшегося поражения мышечной ткани в эксперименте с дефицитом Neu5Gc у мышей [11]. Также одним из механизмов, лежащих в основе мышечной дистрофии, связанной с дефицитом сиаловых кислот (СК), может быть их способность связывать свободные радикалы, образующиеся при мышечной деятельности [12]. В пользу данного механизма свидетельствует факт снижения количества СК в эритроцитах при сахарном диабете, обратно коррелирующего с активностью свободнорадикального окисления [13], а также способность СК муцина активно поглощать гидроксид-анионы (OH^-) и таким образом существенно снижать активность свободнорадикального окисления [14]. О способности СК препятствовать свободнорадикальному окислению говорят и результаты исследований, показавших, что окислению липопротеинов низкой плотности предшествует снижение в их составе СК [15]. Таким образом, изменение количества и состава СК способно повлиять на ζ -потенциал эритроцитов, их длительность циркуляции в крови и подверженность свободнорадикальному окислению.

Одним из первых этапов доставки кислорода в ткани является проникновение эритроцитов в микроциркуляторное русло, зависящее от агрегационной способности эритроцитов, детерминирующейся их ζ -потенциалом [16], величина которого, согласно электрофоретическим исследованиям, в среднем составляет -15 — -16 мВ [17]. Известно, что диаметр и высота эритроцита составляют $7,1$ – $9,2$ мкм и $1,7$ – $2,4$ мкм соответственно. При этом эритроцит способен проникать в капилляры размером до 1 мкм, и для этого он должен изменить свою форму на веретенообразную, удлинясь до 23 мкм [18].

Ряд исследований свидетельствует об участии ζ -потенциала в регуляции деформируемости эритроцитов [19]. Левтов В.А. и соавторы [20] указывают на то, что создаваемого сердцем гидродинамического, а следовательно, и гидростатического давления недостаточно для проталкивания через капилляры форменных элементов крови, а измерение микровязкости крови в капиллярном вискозиметре с нейтральными и отрицательно заряженными пластиковыми капиллярами показало, что в отрицательно заряженном капилляре оно было на 18% меньше, чем в электронейтральном. Расчеты показали, что взаимодействие отрицательных зарядов эритроцитов и эндотелия капилляров создает электростатическую силу, направленную к венозному концу капилляра и обеспечивающую движение эритроцита подобно вкручивающемуся в доску шурупу. Также показано, что снижение величины ζ -потенциала уменьшает скорость продвижения эритроцитов по капилляру вплоть до развития стаза [20]. Об участии СК в формировании ζ -потенциала и увеличении гидрофильности связанных с ними молекул и надмолекулярных комплексов, а также взаимодействии с эндотелиальными клетками свидетельствуют и другие работы [21, 23]. Агрегационная способность эритроцитов оказывает значительное влияние на сосудистое сопротивление артериол, что в значительной степени проявляется при шоковых состояниях, сопровождающихся низким артериальным давлением [24]. Снижение гидростатического давления в артериолах вследствие повышенной агрегационной способности эритроцитов снижает напряжение сдвига эндотелия артериол и, как следствие, уменьшает продукцию ответственного за вазодилатацию оксида азота [25]. Кроме того, авторы указывают на важную роль отрицательно заряженного гликокаликса эндотелия в регуляции напряжения сдвига за счет взаимодействия

с отрицательно заряженными СК эритроцитов. Таким образом, не вызывает сомнения способность сиаловых кислот участвовать в деформируемости эритроцитов, их проникновении в микроциркуляторное русло, регуляции величины просвета артериол за счет влияния на продукцию оксида азота и, как следствие, предотвращении феномена артериализации венозной крови.

Известно, что активность процесса связывания кислорода гемоглобином в легких и отдачи его в тканях регулируются эффектом Вериго – Бора, связанным с конформационными переходами гемоглобина [26].

На способность отдачи кислорода эритроцитами здоровых людей также оказывают влияние микровязкость и микрополярность липидного бислоя мембран. Эти физико-химические свойства мембран зависят от обеспеченности эссенциальными полиненасыщенными жирными кислотами, а при их недостатке – от величины перекисной модификации компонентов мембраны [27, 28]. Ранее нами были опубликованы данные компьютерного моделирования трехмерной структуры мембран-ассоциированного белка полосы 3 (анионного транспортера) при его модификации продуктами свободнорадикального окисления, в которой была показана возможность конформационных изменений этого белка, сопровождающихся ростом анионной селективности для углекислого газа [29]. В свою очередь, увеличение ионной селективности анионного транспортера по углекислому газу способно увеличивать результативность эффекта Вериго – Бора. Таким образом, конформационные переходы белков эритроцитов способны оказать существенное влияние на транспорт кислорода эритроцитами в периферические ткани.

Поскольку анионный транспортер является гликопротеином, ассоциированным с белками цитоскелета [30] и не на постоянной основе с гликофоорином А, являющимся основным носителем сиаловых кислот, определяющих величину ζ -потенциала эритроцитов [31, 32], нельзя исключить возможность участия ζ -потенциала в регуляции конформационных переходов белков эритроцитов и таким образом в регуляции транспорта кислорода. Вместе с тем исследований, посвященных роли ζ -потенциала в регуляции конформационных переходов белков эритроцитов и их связи с механизмами принятия и отдачи кислорода эритроцитами, в доступных литературных источниках не выявлено.

Биосинтез сиаловых кислот

Для теоретического обоснования возможности участия СК в процессах переноса кислорода и энергопродукции был проведен анализ информации о ферментах синтеза и катаболизма СК и их роли в формировании патологических состояний. Синтез N-ацетилнейраминовой кислоты в организме ассоциирован с гликолизом до стадии образования фруктозо-6-фосфата (рис. 2). Далее под действием фруктозо-6-фосфат амидотрансферазы (КФ 2.6.11.16) и глутамина образуется глюкозамин-6-фосфат (GluN-6-P). Этот фермент является ключевым в биосинтезе соединений, использующихся для внеклеточного и внутриклеточного гликозилирования. О важности этого фермента говорит факт смерти клеток с инактивированным геном этого фермента [33]. Дефекты в строении его молекул ассоциированы с диабетом второго типа [34] и онкологическими заболеваниями [35, 36].

В источниках литературы сообщалось о трех изоформах фруктозо-6-фосфат амидотрансферазы, имеющих различия в органной локализации [37].

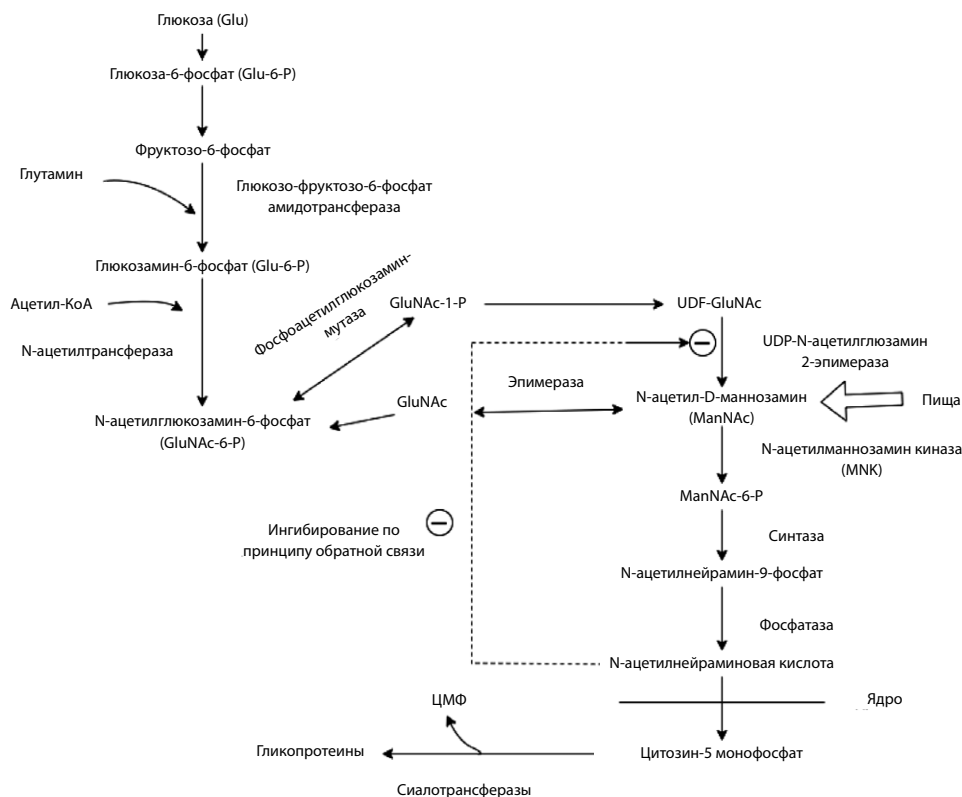


Рис. 2. Схема биосинтеза сиаловых кислот
Fig. 2. The scheme of Sialic Acid Synthesis

Причастность фермента к онкологическим заболеваниям может быть связана с одной из дополнительных функций сиаловых кислот – межклеточного специфического взаимодействия. В свою очередь, причастность к патогенезу сахарного диабета 2-го типа, проявляющаяся в более высокой активности энзима при данном заболевании [34, 38], может быть ассоциирована как с нарушениями специфического взаимодействия инсулина с рецептором, так и с гликозилированием структур клеток эндотелия сосудов микроциркуляторного русла, следствием чего является нарушение взаимодействия эритроцитов и эндотелия. К сожалению, информация о его роли в формировании гликокаликса и заряда эритроцитов в доступной литературе отсутствует.

Реакцию преобразования GluN-6-P в N-ацетилглюкозамин-6-фосфат (GluNAc-6-P) катализирует глюкозамин-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.4). У человека данный фермент представлен в виде димера с одинаковыми субъединицами [39], кодируемого геном GNP NAT и экспрессируемого главным образом в печени и желудочно-кишечном тракте. В литературе указывается на ассоциацию данного фермента с аденокарциномой легких [40] и сахарным диабетом [41]. Как и в случае с предыдущим

ферментом, прямых указаний на роль глюкозамин-фосфат N-ацетилтрансферазы в формировании гликокаликса эритроцитов в литературе не опубликовано. Однако о причастности к онкопатологии, при которой нарушаются процессы формирования гликокаликса, можно судить и по изменению процесса формирования сиаловых кислот эритроцитов.

Следующий фермент в ряду участников синтеза N-ацетилнейраминовой кислоты – фосфоацетилглюкозамин-мутаза (рис. 2), преобразующий GluNAc-6-P в N-ацетилглюкозамин-1-фосфат (GluNAc-1-P), принадлежит к семейству гексозофосфатмутаз человека (КФ 5.2.2.2) [42]. Не может не обратить на себя внимание то обстоятельство, что активность гена, кодирующего структуру этого фермента, увеличивается под действием эритропоэтина (ЭПО) [43]. Учитывая, что ЭПО оказывает влияние и на эндотелиальные клетки [44], можно полагать о наличии связи активности данного фермента с состоянием системы микроциркуляции крови и, как следствие, с доставкой кислорода в ткани. В доступной литературе не удалось найти сведений об участии этого фермента в формировании патологических состояний.

Следующим ферментом – участником синтеза N-ацетилнейраминовой кислоты является UDF-N-ацетилглюкозамин 2-эпимераза (КФ 5.1.3.14). Он представляет собой фермент, активность которого регулируется по принципу обратной связи конечным продуктом – N-ацетилнейраминовой кислотой. У мышей с инактивированным геном данного фермента отмечается внутриутробная гибель плода, связанная с нарушением формирования микроциркуляторного русла головного мозга и внутрижелудочковым кровоизлиянием [45]. Дефект гена эпимеразы приводит к мышечной дистрофии у экспериментальных животных [46] и у человека [47, 48]. Роль фермента в формировании гликокаликса эритроцитов не описана. Однако, учитывая его способность участвовать в формировании эндотелиальных клеток, можно предположить и возможность участия этого энзима в транспорте кислорода в ткани.

Следующий участник биосинтеза сиаловых кислот – N-ацетилманнозамин-киназа (КФ 2.7.1.60). Считается, что данный фермент является бифункциональным и осуществляет как эпимеразную, так и киназную реакции [49]. Генетический дефект данного фермента приводит к развитию миопатии Нонака, частота встречаемости которой составляет от 1 до 9 случаев на 1 000 000 населения [50]. Заболевание связано с пониженной сиалинизацией клеток мышечной ткани. Кроме того, для генетического дефекта данного фермента описано нарушение электронно-микроскопической структуры митохондрий клеток, экспрессирующих повышенное количество дефектного гена, сопровождающееся снижением их трансмембранного потенциала [51] и, как следствие, снижением активности продукции АТФ. Приведенные данные свидетельствуют о причастности ферментов синтеза сиаловых кислот к системе доставки и использования кислорода в мышечной ткани.

Следующим ферментом в полиферментативной системе является N-ацетилнейрамин-9-фосфат синтаза (КФ 2.7.7.43), осуществляющая реакцию конденсации фосфоенолпирувата (ФЕП) и N-ацетилманнозамин-6-фосфата (ManNAc-6-P) [52, 53]. Обсуждается также причастность фермента к продукции дезаминированной формы нейраминовой кислоты – 2-кето-3-дезоксид-Д-глицеро-Д-галактононовой кислоты [54]. В научной литературе не довелось встретить информацию об ассоциации дефектов данного фермента с патологическими состояниями.

Последним ферментом в ряду синтеза N-ацетилнейраминовой кислоты является N-ацилнейрамин-9-фосфатаза (КФ 3.1.3.29). В настоящее время в научной литературе также отсутствуют сведения об ассоциации дефектов этого фермента с патологическими состояниями. Известно, что этот фермент обладает невысокой субстратной специфичностью и способен дефосфорилировать не только N-ацилнейрамин-9-фосфат, но и ряд других сахаров, в связи с чем допускается возможность снижения активности продукции N-ацетилнейраминовой кислоты в связи с конкуренцией фермента за иные субстраты [55].

Таким образом, исходя из имеющихся в литературе сведений о ферментах синтеза N-ацетилнейраминовой кислоты, можно заключить, что дефекты этих ферментов причастны к развитию спектра различных заболеваний. Разнообразие возникающих патологических процессов обусловлено широким использованием продуктов реакций, катализируемых данными ферментами в посттрансляционной модификации белков, о которых наука располагает далеко не полной информацией. Вместе с тем, учитывая способность ЭПО влиять на активность продукции сиаловых кислот, а также использование сиаловых кислот в формировании эндотелиальных клеток и митохондрий, можно судить о причастности сиаловых кислот к транспорту и использованию кислорода.

Помимо синтеза сиаловых кислот их количество регулируется и процессами разрушения с участием ферментов – сиалидаз (нейраминидаз), ассоциированных с мембраной эритроцитов. Сиалидазы (КФ. 3.2.1.18) – группа ферментов, катализирующих гидролиз α -гликозидных связей между остатками сиаловой кислоты и углеводными группами гликопротеинов и гликолипидов. У млекопитающих описано четыре типа сиалидаз: NEU1, NEU2, NEU3 и NEU4 [56], имеющих различную клеточную локализацию. NEU1 локализуется в лизосомах и участвует в экзоцитозе, иммунном ответе, фагоцитозе и сборке эластических волокон. NEU2 локализуется в цитозоле, цитоплазматической мембране и участвует в дифференцировке миобластов и нейронов. NEU3 и NEU4 участвуют в дифференцировке нейронов, апоптозе и адгезии; при этом NEU3 локализована в цитоплазматической мембране, тогда как NEU4 – в лизосомах, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [57]. Из всех сиалидаз NEU1 наиболее изучена. Ее дефицит приводит к внутриутробной или младенческой смертности.

Еще одним ферментом деградации СК является N-ацетилнейрамин-пируват-лиаза (КФ 4.1.3.3). Данный фермент является внутриклеточным и разрушает поглощенную эритроцитом сиаловую кислоту до пирувата и N-ацетилманнозамина [58]. Дефект гена N-ацетилнейрамин-пируват-лиазы приводит к непереносимости физической нагрузки с атрофией мышц и поражением сердечной мышцы. Инактивирование этого гена в эксперименте приводит к аналогичному повреждению мышечной ткани [59].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы о ферментах синтеза и деградации сиаловых кислот показал их причастность к транспорту кислорода (по меньшей мере через эритропоэтин) и его стимулирующее влияние на гексафосфомутазу (КФ 5.2.2.2), а также сиалирование эритроцитов и эндотелиальных клеток, изменения структуры митохондрий, сопровождающиеся модификацией трансмембранного потенциала, внутриэритроцитарное разрушение N-ацетилнейраминовой кислоты N-ацетилнейрамин-пируват-лиазой.

Исследование участия сиаловых кислот в процессах доставки кислорода в ткани и митохондрии клеток позволит существенно продвинуться в понимании механизмов энергообеспечения клеток, а также в разработке способов влияния на них в норме и при патологических состояниях.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Bonora M., Patergnani S., Rimessi A. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal.* 2012;8(3):343–357. doi: 10.1007/s11302-012-9305-8
- Vieby C.B.B., Simeunovic A., Heier M. Venular oxygen saturation is increased in young patients with type 1 diabetes and mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2020;98(8):800–807. doi: 10.1111/aos.14462
- Hammer M., Vilsner W., Riemer T. Diabetic patients with retinopathy show increased retinal venous oxygen saturation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(8):1025–1030. doi: 10.1007/s00417-009-1078-6
- Telen M.J. Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. *Transfus Med Rev.* 2005;19(1):32–44. doi: 10.1016/j.tmr.2004.09.006
- Yawata Y. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model.* Wiley-VCH Verlag GmbH. 2003.
- Kooner A.S., Yu H., Chen X. Synthesis of N-Glycolylneuraminic Acid (Neu5Gc) and Its Glycosides. *Front Immunol.* 2019;10:1–24. doi: 10.3389/fimmu.2019.02004
- Scheinthal, B.M. Multiple forms of sialic acids. *Carbohydr Res.* 1968;6:257–265. doi: 10.1016/s0008-6215(00)81447-0
- Davies R.L. Why Is N-Glycolylneuraminic Acid Rare in the Vertebrate Brain? *Top Curr Chem.* 2015;366:31–54. doi: 10.1007/128_2013_419
- Davies R.L., Pearce M.T., Tessier B.M. Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: resistance of α 2-8-linked N-glycolylneuraminic acid to enzymatic cleavage. *J Biol Chem.* 2012;287(34):28917–28931. doi: 10.1074/jbc.M112.365056
- Tringali C., Fiorilli A., Venerando B. Different behavior of ghost-linked acidic and neutral sialidases during human erythrocyte ageing. *Glycoconjugate J.* 2001;18(5):407–418. doi: 10.1023/a:1014816232197
- Chandrasekharan K., Yoon H.J., Xu Y. A human-specific deletion in mouse Cmah increases disease severity in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 2010;2(42):42–54. doi: 10.1126/scitranslmed.3000692
- Cho A., Malicdan M.C., Miyakawa M. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(16):3081–3093. doi: 10.1093/hmg/ddx192
- Shahwali S., Shahesmaeili A., Sanjari M. The correlation between blood oxidative stress and sialic acid content in diabetic patients with nephropathy, hypertension, and hyperlipidemia. *Diabetol Int.* 2020;11(1):19–26. doi: 10.1007/s13340-019-00395-9
- Ogasawara Y., Namai T., Yoshino F. Sialic acid is an essential moiety of mucin as a hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* 2007;581(13):2473–2477. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.062
- Serdar Z., Yesilbursa D., Dirican M. Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(6):655–664. doi: 10.1002/cbf.1369
- Izumida Y., Seiyama A., Maeda N. Erythrocyte aggregation: bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1067(2):221–226. doi: 10.1016/0005-2736(91)90047-c
- Tokumasu F., Nardone G., Ostera R.G. Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes. *PLoS One.* 2009;4(6):1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0005828
- Novitskii V. *Physiology and Pathophysiology of Erythrocyte.* Tomsk: Tomsk TGU; 2004. (in Russian)
- Gondelaud F., Connes P., Nader E. Sialic acids rather than glycosaminoglycans affect normal and sickle red blood cell rheology by binding to four major sites on fibrinogen. *Am J Hematol.* 2020;95(4):77–80. doi: 10.1002/ajh.25718
- Levtov V.A. *Blood Rheology.* Moscow: Medicine; 1982. (in Russian)
- Kunitsyn V., Mokrushnikov P., Panin L. Mechanism of Erythrocyte Microcirculation in capillary vessels at physiological changes of pH. *Siberian Scientific Medical Journal.* 2007;5(127):28–32. (in Russian)
- Schauer R., Kamerling J. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2018;75:1–213. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.001
- Yang Y., Koo S., Heng L.T. Non-adsorbing macromolecules promote endothelial adhesion of erythrocytes with reduced sialic acids. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(1):288–293. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.031
- Bishop J., Nance P., Popel A. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(1):222–236. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.1.H222
- Gonchar I., Balashov S., Valiev O. Role of endothelial glycocalyx in the mechanogenic regulation of arterial tone. *Proceedings of MIPT.* 2017;9(1):101–108. (in Russian)
- Kosmachevskaya O., Topunov A. Alternate and additional function of the erythrocyte hemoglobin. *Biochemistry.* 2019;84(1):3–23. (in Russian)
- Martsinkevich A., Osochuk S. Physical-Chemical properties of erythrocytes membranes and high density lipoproteins of sportsmen of cyclic sports. *Journal of the Belarusian State University.* 2015;3(1):84–89. (in Russian)
- Martsinkevich A., Osochuk S. Control method of essential fatty-acids consumption dose of cyclic kind of sports' sportsmen. *Applied Sports Science.* 2017;6(2):48–52. (in Russian)
- Martsinkevich A., Osochuk S. Computer simulation of structure of erythrocyte membrane anionic transporter in athletes of cyclic sports under condition of anionic oxidative modification. *Modern problems of biochemistry and molecular biology.* 2018;419–426. (in Russian)
- Abbas Y., Toye A., Rubinstein J. Band 3 function and dysfunction in a structural context. *Curr Opin in Hematol.* 2018;25(3):163–170. doi: 10.1097/MOH.0000000000000418
- Zdebska E., Musielak M., Jaeken J. Band 3 glycoprotein and glycophorin A from erythrocytes of children with congenital disorder of glycosylation type-la are underglycosylated. *Proteomics.* 2001;1(2):269–274. doi: 10.1002/1615-9861(200102)1:2<269::AID-PROT269>3.0.CO;2-8
- Giger K., Habib I., Ritchie K. Low Diffusion of glycophorin A in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(11):2839–2845. doi: 10.1016/j.bbame.2016.08.012
- Wu G., Sun Y., Qu W. Application of GFAT as a novel selection marker to mediate gene expression. *PLoS One.* 2011;6(2):1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0017082

34. Srinivasan V., Sandhya N., Sampathkumar R. Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) gene expression and activity in patients with type 2 diabetes: inter-relationships with hyperglycaemia and oxidative stress. *Clin. Biochem.* 2007;40(13–14):952–957. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.05.002
35. Dong T., Kang X., Liu Z. Altered glycometabolism affects both clinical features and prognosis of triple-negative and neoadjuvant chemotherapy-treated breast cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(6):8159–8168. doi: 10.1007/s13277-015-4729-8
36. Ren S., Shao Y., Zhao X. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals major metabolic pathways and potential biomarker involved in prostate cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(1):154–163. doi: 10.1074/mcp.M115.052381
37. Oliveira I., Allonso D., Fernandes T. Enzymatic and structural properties of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (hGFAT2). *J Biol Chem.* 2020;296:1–24. doi: 10.1074/jbc.RA120.015189
38. Nakaishi Y., Bando M., Shimizu H. Structural analysis of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase, a key regulator in type 2 diabetes. *FEBS Lett.* 2009;583(1):163–167. doi: 10.1016/j.febslet.2008.11.041
39. Wang J., Liu X., Liang Y. Acceptor substrate binding revealed by crystal structure of human glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase 1. *FEBS Lett.* 2008;582(20):2973–2978. doi: 10.1016/j.febslet.2008.07.040
40. Zhang S., Zhang H., Li H. Potential role of glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 in the development of lung adenocarcinoma. *Aging (Albany NY).* 2021;13(5):7430–7453. doi: 10.18632/aging.202604
41. Zhao M., Li H., Ma Y. Nanoparticle abraxane possesses impaired proliferation in A549 cells due to the underexpression of glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase 1 (GNPNAT1/GNA1). *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1685–1697. doi: 10.2147/IJN.S129976
42. Pang H., Koda Y., Soejima M. Identification of human phosphoglucomutase 3 (PGM3) as N-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1) *Ann. Hum. Genet.* 2002;66(2):139–144. doi: 10.1017/S0003480002001033
43. Li C., Rodriguez M., Banerjee D. Cloning and characterization of complementary DNA encoding human N-acetylglucosamine-phosphate mutase protein. *Gene.* 2000;242(1–2):97–103. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00543-0
44. Fliser D., Bahlmann F. Erythropoietin and the endothelium – a promising link? *Eur J Clin Invest.* 2008;38(7):457–461. doi: 10.1111/j.1365-2362.2008.01968.x
45. Wedekind H., Kats E., Weiss A. Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase deletion in mice leads to lethal intracerebral hemorrhage during embryonic development. *Glycobiology.* 2021;31(11):1478–1489. doi: 10.1093/glycob/cwab069
46. Cho A., Christine M., Malicdan V. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(16):3081–3093. doi: 10.1093/hmg/ddx192
47. Broccolini A., Ricci E., Cassandrini D. Novel GNE Mutations in Italian Families with Autosomal Recessive Hereditary Inclusion-Body Myopathy. *Hum Mutat.* 2004;23(6):632. doi: 10.1002/humu.9252
48. Miao J., Wei X., Wang J. A case report: identification of a novel exon 1 deletion mutation in the GNE gene in a Chinese patient with GNE myopathy. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(41):1–4. doi: 10.1097/MD.00000000000022663
49. Hinderlich S., Weidemann W., Horstkorte T. UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis. *Top Curr Chem.* 2013;366:97–137. doi: 10.1007/128_2013_464
50. Carrillo N., Malicdan M., Huizing M. GNE Myopathy: Etiology, Diagnosis, and Therapeutic Challenges. *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):900–914. doi: 10.1007/s13311-018-0671-y
51. Reema S., Ranjana A. GNE Myopathy and Cell Apoptosis: A Comparative Mutation Analysis. *Mol Neurobiol.* 2016;53(5):3088–3101. doi: 10.1007/s12035-015-9191-5
52. Nakata D., Close B., Colley K. Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(2):642–648. doi: 10.1006/bbrc.2000.2983
53. Tanner M. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg Chem.* 2005;33(3):216–228. doi: 10.1016/j.bioorg.2005.01.005
54. Lawrence S., Huddleston K., Pitts L. Cloning and Expression of the Human N-Acetylneuraminic Acid Phosphate Synthase Gene with 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic Acid Biosynthetic Ability. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17869–17877. doi: 10.1074/jbc.M000217200
55. Anke P., Sun L., Schulz M. Activity of N-acylneuraminic acid 9-phosphatase (NANP) is not essential for de novo sialic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(10):1471–1479. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.05.011
56. Glanz V., Myasoedova V., Grachko A. Sialidase activity in human pathologies. *Eur J Pharmacol.* 2019;842:345–350. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.11.014
57. Miyagi T., Yamaguchi K., Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology.* 2012;22(7):880–896. doi: 10.1093/glycob/cws057
58. Bulai T., Bratosin D., Artenie V. Uptake of sialic acid by human erythrocyte. Characterization of a transport system. *Biochimie.* 2003;85(1–2):241–244. doi: 10.1016/S0300-9084(03)00059-2
59. Wen X., Graovac M., Arzamendi K. Sialic acid catabolism by N-acetylneuraminic acid pyruvate lyase is essential for muscle function. *JCI Insight.* 2018;3(24):1–5. doi: 10.1172/jci.insight.122373

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.010>
УДК 616.34-008.87



Скоповец Е.Я.✉, Белевцев М.В.

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

Изменения микробиома кишечника при первичных иммунодефицитах: обзор современных данных

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Скоповец Е.Я. – концепция и дизайн исследования, обзор литературы; Белевцев М.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование.

Подана: 21.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: skopovets@yandex.by

Резюме

Первичные иммунодефициты – группа гетерогенных генетических заболеваний, приводящих к развитию как качественной (или функциональной) недостаточности, так и неконтролируемой активации пролиферации иммунокомпетентных клеток с формированием аутоиммунных, аутовоспалительных и аллергических заболеваний. Кишечная микробиота и ее метаболиты влияют на функции иммунной защиты и иммунный гомеостаз как локально, так и системно. Это подтверждается тем, что многие пациенты с первичными иммунодефицитами имеют осложнения в виде воспалительных заболеваний кишечника. Недавние исследования показали, что генетические дефекты, вызывающие первичные иммунодефициты, приводят к нарушениям механизмов, лежащих в основе гомеостаза кишечника, изменению иммунного надзора за кишечным барьером, повышению кишечной проницаемости и бактериальной транслокации. Многие инфекционные агенты при первичных иммунодефицитах усиливают колонизацию патобионтов, что приводит к повышенной восприимчивости организма и развитию вторичных инфекционных заболеваний. Коррекция дисбиотических состояний с помощью изменения состава микробиоты кишечника может быть полезна для снижения риска инфекционных осложнений заболевания.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, микробиом, воспалительные заболевания кишечника, тяжелый комбинированный иммунодефицит, дисбиоз, секвенирование

Skapavets K.✉, Belevtsev M.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Changes in the Intestinal Microbiome in Primary Immunodeficiency: Review of Current Data

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Skapavets K. – the concept and design of the study, literature review; Belevtsev M. – the concept and design of the study, editing.

Submitted: 21.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: skopovets@yandex.by

Abstract

Primary immunodeficiencies are a group of heterogeneous genetic diseases that lead to the development of both qualitative and (or) functional deficiency, as well as uncontrolled activation of the proliferation of immunocompetent cells and the formation of autoimmune, autoinflammatory and allergic diseases. The gut microbiota and its metabolites influence immune defense functions and immune homeostasis both locally and systemically. This is supported by the fact that many patients with primary immunodeficiencies have complications in the form of inflammatory bowel disease. Recent studies have shown that the genetic defects that cause primary immunodeficiencies lead to disruption of the mechanisms underlying intestinal homeostasis, altered immune surveillance of the intestinal barrier, increased intestinal permeability, and bacterial translocation. Many infectious agents in primary immunodeficiencies enhance the colonization of pathobionts, which leads to an increased susceptibility of the body and the development of secondary infectious diseases. Correction of dysbiotic conditions by changing the composition of the intestinal microbiota may be useful in reducing the risk of infectious complications of the disease.

Keywords: Primary immunodeficiency, microbiome, inflammatory bowel disease, severe combined immunodeficiency, dysbiosis, sequencing

■ ВВЕДЕНИЕ

Первичные иммунодефициты (ПИД) представляют собой группу гетерогенных генетических заболеваний, приводящих к развитию как качественной (или функциональной) недостаточности, так и неконтролируемой активации пролиферации иммунокомпетентных клеток с формированием аутоиммунных, аутовоспалительных и аллергических заболеваний [1]. В условиях дефектов иммунной функции нарушение иммунитета на уровне слизистой оболочки кишечника может привести к дисбиозу, повышенной проницаемости кишечного барьера и местному воспалительному процессу.

Традиционно для идентификации микроорганизмов используются культуральные методы, однако большинство (>90–95%) представителей микрофлоры не могут

быть культивированы с использованием современных лабораторных методов. Достижения в области молекулярной биологии в сочетании с технологиями высокопроизводительного секвенирования ДНК «нового поколения» расширили понимание основных механизмов, которые контролируют гомеостаз и вызывают дисбиоз кишечной микробиоты. Факультативные анаэробные патогены ЖКТ развиваются в воспалительной среде отчасти благодаря их способности использовать нитриты в качестве акцепторов электронов – особенность, которой не обладают многие симбионты [2].

Микробиом кишечника у пациентов с ПИД характеризуется как качественными, так и количественными изменениями, возникает микробный дисбиоз, снижение иммунного контроля и уменьшение разнообразия микробиома, микробная транслокация, местное воспаление. Эти биологические детерминанты в присутствии других кофакторов, таких как питание, прием антибиотиков, генетические дефекты, дисфункция иммунитета слизистых оболочек и др., могут приводить к воспалению и иммунной дисрегуляции в виде аутоиммунных, лимфопролиферативных заболеваний, увеличению риска злокачественных новообразований, тем самым снижая качество жизни пациентов [3].

Все большее значение приобретает потенциальная роль микробной транслокации в иммунопатологии ПИД, в частности, механизмы, которые связаны с изменениями состава микробиоты – набора микроорганизмов определенной локализации, микробных сообществ, в том числе кишечника человека [4].

Определив количественный и качественный состав микробиоты кишечника у пациентов с ПИД, станет возможной коррекция дисбиотических состояний с целью снижения риска воспалительных осложнений в моделях ПИД с помощью терапевтических препаратов микробиологического происхождения: пробиотиков, аутопробиотиков, пребиотиков, симбиотиков и др.

■ ГОМЕОСТАЗ И ДИСБИОЗ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

Гомеостатический баланс кишечной микрофлоры играет важную роль для поддержания здоровья организма человека, изменение микробного состава вызывает резкий дисбаланс между полезными и потенциально патогенными бактериями, кишечник становится уязвимым для поражения патогенами с изменениями бактериального состава в ЖКТ. Этот дисбаланс микробного равновесия представляет собой «дисбиоз», который в дальнейшем был определен как нарушение гомеостаза кишечной микробиоты вследствие дисбаланса самой флоры, изменения ее функционального состава и метаболической активности или вследствие изменения их локального распределения.

Термин «альфа-разнообразие» введен для описания среднего разнообразия микробных видов в кишечнике. Более высокое видовое разнообразие приводит к повышению устойчивости кишечной экосистемы. Принято считать, что здоровый, устойчивый кишечный микробиом зависит от большого богатства и биоразнообразия. Дисбиоз можно разделить на три различных типа:

- снижение численности симбиотических микроорганизмов ЖКТ;
- чрезмерный рост потенциально вредных микроорганизмов ЖКТ;
- потеря общего микробного разнообразия.

Все три типа дисбиотических состояний не являются взаимоисключающими и могут возникать одновременно. Дисбиоз вовлечен в широкий спектр заболеваний, включая воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), аллергические заболевания, ожирение, аутоиммунные патологии, нейродегенеративные заболевания [5–7].

■ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ

Роль микробиоты кишечника все чаще признается ведущей в регуляции гомеостаза иммунных клеток. Сигналы от бактерий кишечника запускают системные иммунные реакции и регулируют про- и противовоспалительные иммунные реакции хозяина (рис. 1).

Патогенные микроорганизмы распознаются Toll-подобными (TLR) и NOD-подобными рецепторами (NLR) на клетках врожденного иммунитета (дендритные клетки (DC), макрофаги), клетках Панета и эпителиальных клетках кишечника (рис. 2).

Дендритные клетки (CX3CR1) образуют выросты для фагоцитоза, в то время как CD103+ дендритные клетки мигрируют в пейеровы бляшки или мезентеральные лимфатические узлы, чтобы представить антигены «наивным» клеткам. При активации комменсалами ДК синтезируют IL12, IL15 и интерферон (IFN), происходит активация NK-клеток.

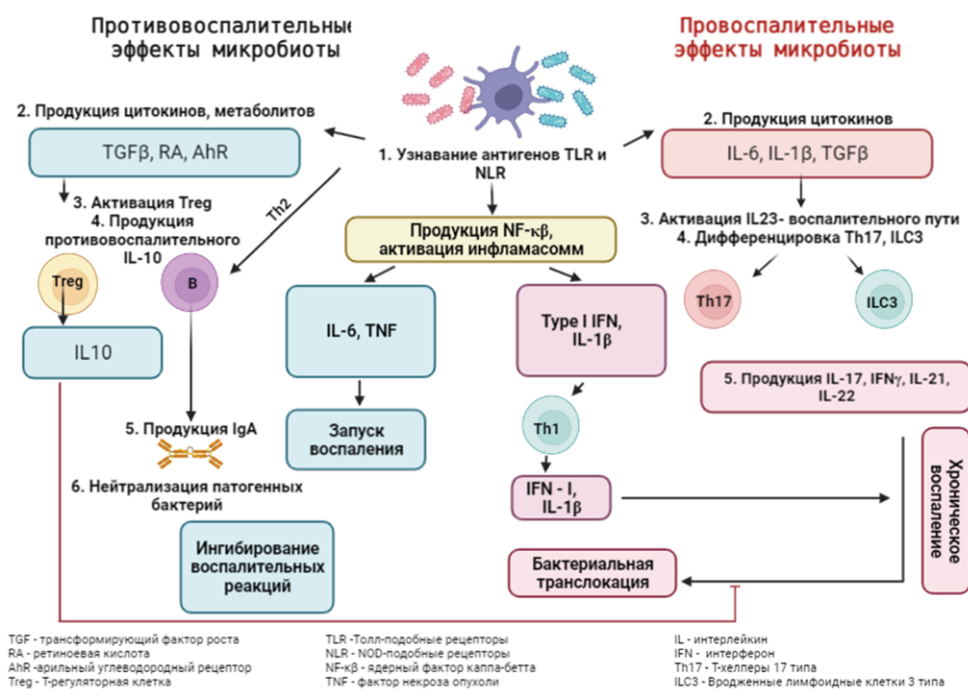


Рис. 1. Провоспалительные и противовоспалительные эффекты микробиоты
 Fig. 1. Pro-inflammatory and anti-inflammatory effects of the microbiota

Короткоцепочечные жирные кислоты (англ. SCFA) также способствуют выработке ДК клетками цитокинов IL6, IL12, интерферона (IFN), фактора некроза опухоли (TNF). Активированные NK-клетки обладают надлежащей цитотоксичностью и способствуют секреции цитокинов для выполнения противомикробной и противовирусной функции [8].

Эпителиальные клетки кишечника (англ. IEC) в ответ на комменсальные микроорганизмы продуцируют IL25, IL33 и стромальный лимфопоэтин тимуса (TSLP) для активации врожденных лимфоидных клеток 2-го типа ILC2.

Клетки Foxp3+Treg и клетки Tfh/ex-Th17 локализуются в пейеровых бляшках и способствуют переключению класса В-клеток и продукции IgA, которые затем секретируются в слизистой оболочке кишечника.

Колонизация *Bacteroides fragilis* способствует дифференцировке CD4+ Т-клеток посредством презентации полисахарида А (PSA) из дендритных клеток. В присутствии TGFβ CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в индуцированный Treg (iTreg-клетки) и продуцировать IL-10, способствуя гомеостазу тканей.

Главный комплекс гистосовместимости II класса (MHC II), экспрессируемый ILC3, способен представлять антигены комменсальных микроорганизмов CD4+ Т-клеткам, ограничивая их аутореактивность. Активированные ILC3 секретируют IL22, который также присоединяется к защите от патогенов: стимулирует выработку антимикробных пептидов (RegIIIβ, RegIIIγ). TLR2-рецепторы имеют решающее значение для поддержания целостности эпителиальных клеток кишечника (IEC), регулируя восприимчивость кишечника к воспалению. Инвазивные возбудители внедряются в этом случае в слой собственной пластинки кишечника. Фагоциты выполняют защитную функцию организма посредством фагоцитоза и продукции цитокинов IL6, IL23.

Передача сигналов TLR и NLR также приводит к активации ядерного фактора каппа-бетта (NF-κβ) и инфламмасом, секреции провоспалительных цитокинов и активации Т-хелперов 1-го типа (T_H1). Воспалительные реакции приводят к повреждению эпителия, потере секретирующих слизь бокаловидных клеток и бактериальной транслокации, что дополнительно стимулирует воспалительный ответ [9].

■ МИКРОБИОМ ЖКТ ПРИ ТЯЖЕЛОМ КОМБИНИРОВАННОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

Тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИН) и комбинированный иммунодефицит (КИН) представляют собой гетерогенную группу генетических заболеваний, при которых происходят изменения функционирования гуморального и клеточного звена иммунитета. Иммунологический фенотип ТКИН характеризуется отсутствием циркулирующих Т-лимфоцитов, нормальным или повышенным количеством В-лимфоцитов. ТКИН обычно проявляется в первый год жизни, у пациентов часто возникают оппортунистические инфекции, имеются задержки развития, наблюдается хроническая диарея.

Комбинированный иммунодефицит (КИН) также характеризуется повышенной восприимчивостью к рецидивирующим и опасным для жизни инфекциям; однако из-за остаточной функции Т-клеток клиническое начало часто задерживается (>1 года), по сравнению с ТКИН, и тяжесть заболевания снижена.

В условиях изменения нормального функционирования Т-клеточного звена иммунитета у пациентов часто возникают тяжелые патологические состояния, вызванные вирусами, грибковыми патогенами, простейшими и бактериями, что подтверждает необходимость изучения микробиоты у пациентов с данным заболеванием. В отсутствие терапии (в частности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), генной терапии (ГТ) или ферментозаместительной терапии) пациенты с ТКИН обычно умирают в течение первых лет жизни [10].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является частым необходимым методом лечения ТКИН и КИН, однако у пациентов возникает высокая частота тяжелых инфекционных заболеваний и повышенный риск возникновения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при ТГСК.

Влияние изменений в составе микробиоты ЖКТ у пациентов с ТКИН впервые изучили Lane J. с соавторами. Они проанализировали состав кишечной микробиоты при ТКИН и продемонстрировали различия в микробном составе кишечника до и после ТГСК. Ввиду небольшого количества пациентов (n=3) нельзя сделать однозначных выводов, однако у всех пациентов было диагностировано низкое микробное разнообразие, связанное с доминированием некоторых таксонов (*Escherichia*, *Enterococcus* и *Staphylococcus*) [11]. Кроме количественных изменений в составе микробиоты ЖКТ, описаны качественные изменения микробных продуктов. В частности, анализ метаболитов показал индивидуальные различия между образцами до и после ТГСК у пациентов с ТКИН [12]. Хотя возможная иммунорегуляторная роль бактериальных метаболитов не до конца изучена, метаболиты кишечной микробиоты могут представлять собой новые биомаркеры для мониторинга кишечного и системного воспаления во время ТГСК.

Многочисленные исследования показывают, что кишечная микробиота ЖКТ влияет на развитие РТПХ как у взрослых, так и у детей [13, 14]. Хотя точные механизмы связи микробиоты и развития РТПХ не изучены, Bashir A. с соавторами в своих работах показали, что более высокое разнообразие в составе микробиома пациентов, повышенная относительная численность симбиотической *Blautia* и более низкая относительная численность известного патобионта *F.nucleatum* могут защитить от возникновения тяжелой формы РТПХ. Способность *Fusobacterium* секретировать TNF-альфа и IL-6 была продемонстрирована в исследованиях *in vitro* [14]. Как утверждают Zeiser и Chen Y. и соавт., эти цитокины могут вовлекать донорские Т-клетки, ответственные за осложнения оРТПХ [16, 17].

Эти результаты подтверждают важность определения профиля микробиоты ЖКТ для обогащения симбиотическими видами и снижения количества потенциально провоспалительных бактерий с целью снижения рисков воспалительных осложнений после ТГСК.

Манипулирование кишечной микробиотой посредством фармакологической модификации или трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) может формировать состав микробиоты и модулировать иммунный ответ после ТГСК в пользу пациентов.

■ МИКРОБИОМ ЖКТ ПРИ СИНДРОМЕ ВИСКОТТА – ОЛДРИЧА

Синдром Вискотта – Олдрича (WAS) представляет собой X-сцепленное генетическое заболевание, вызванное мутацией в гене WAS, кодирующем белок WAS

(WASp). Белок WAS (WASp), который экспрессируется неэритроидными гемопоэтическими клетками, является ключевым регулятором полимеризации актина и играет важную функциональную роль в развитии, подвижности и активации почти всех типов врожденных и адаптивных клеток иммунитета посредством актин-зависимого и актин-независимых механизмов. Потеря активности WASp приводит к WAS, характеризующемуся комплексным иммунодефицитом, экземой, малигнизацией, аутоиммунными и воспалительными симптомами. Так как у пациентов с данным генетическим дефектом часто возникают рецидивирующие инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, а генетический дефект в гене WAS приводит к изменению функционирования клеток врожденного иммунитета, необходим дальнейший анализ микробиома при данной патологии.

По данным исследований, у 5–10% пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича развиваются ВЗК [18]. В экспериментах Liang Zhang с соавторами на мышах с дефицитом WASP (WASp-KO) развивался спонтанный колит, который характеризовался нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрацией в lamina propria толстой кишки. Однако точные механизмы, посредством которых дефицит WASp приводит к ВЗК, не изучены.

Несмотря на отсутствие типичных клинических проявлений у пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича, низкая экспрессия WASP может быть связана с развитием ВЗК и дисбиозом.

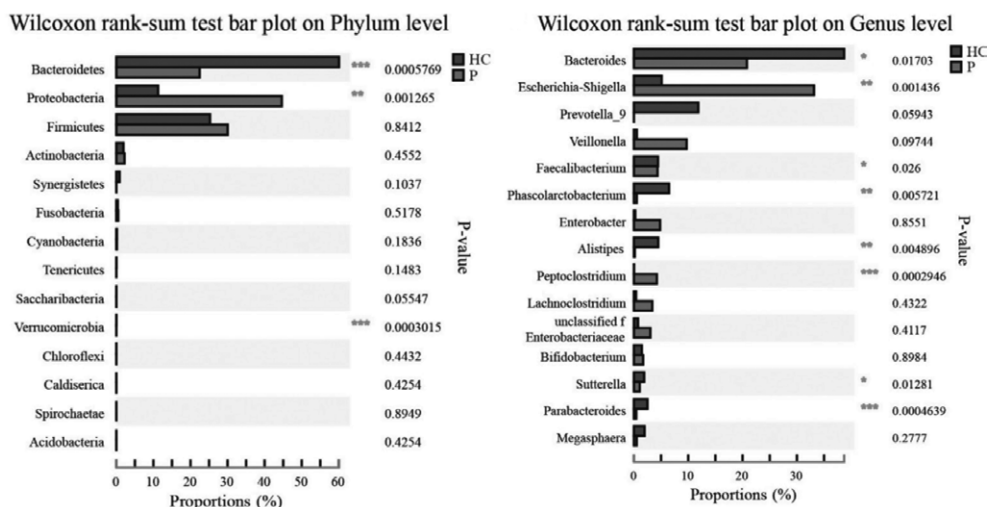


Рис. 3. Интегральное распределение на уровне типов и родов у детей с WAS и здоровых контролей. *.01<P<.05 по сравнению с контролем; **.001<P≤0,01 по сравнению с контрольной группой; * P≤0,001 по сравнению с контролем. HC – группа здоровых лиц; P – пациенты с синдромом Вискотта – Олдрича [19]**

Fig 3. Integral distribution at the phylum and genus levels in children with WAS and healthy controls. *.01<P<.05 vs control; **.001<P≤.01 vs controls; *P≤.001 vs controls. HC – healthy controls; P – WAS patients [19]**

В нескольких исследованиях была изучена роль WASp в регуляции противовоспалительных функций иммунных клеток в контексте гомеостаза кишечника и охарактеризованы ответы у пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича, результаты показывают, что регуляторные Т- и В-клетки, макрофаги и другие врожденные иммунные клетки теряют свойства толерантности, что приводит к провоспалительной среде в кишечнике.

Zhang L. с соавторами исследовали изменения в составе кишечной микробиоты у детей с синдромом Вискотта – Олдрича и выявили изменения, которые могут быть ассоциированы с ВЗК, приводя к микробному дисбиозу у пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича (рис. 3) [19].

У детей с синдромом Вискотта – Олдрича был изменен состав фекальной микробиоты на различных таксономических уровнях. Относительная численность (на уровне типа) Bacteroidetes и Verrucomicrobia у детей с мутацией в гене WAS была заметно ниже, а доля Proteobacteria была заметно выше, чем в контрольной группе здоровых лиц. Кроме того, численность (на уровне рода) Bacteroides, Faecalibacterium, Phascolarctobacterium, Alistipes, Sutterella и Parabacteroides была значительно ниже, а Escherichia-Shigella и Peptoclostridium была значительно выше у детей с синдромом Вискотта – Олдрича [19]. Таким образом, бактерии кишечника могут быть полезными мишенями для мониторинга и терапевтического лечения ВЗК у пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича.

■ МИКРОБИОМ ЖКТ ПРИ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТАХ С ПРЕИМУЩЕСТВЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ АНТИТЕЛ

Общий вариабельный иммунодефицит является наиболее частым первичным иммунодефицитом и классически проявляется в разном возрасте, сопровождается рецидивирующими инфекциями дыхательных путей, которые часто приводят к структурным повреждениям легких. Более чем у половины всех пациентов с ОВИН развиваются неинфекционные осложнения: лимфопролиферативные, гранулематозные заболевания, злокачественные новообразования или аутоиммунные патологии. Генетическая поломка наиболее часто встречается в генах NFKB1, NFKB2, ICOS, TNFRSF13B, TNFRSF13C, CD19, CR2, MS4A1, CD81, IL21, LRBA, CTLA4, PRKCD и IKZF1. Осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта отмечаются у 20–60% пациентов с ОВИН, при этом инфекционная диарея возникает в 30–50% случаев [20]. Микробный дисбаланс кишечника у пациентов с ОВИН в основном включает изменения в микробном разнообразии, уменьшение симбиотических полезных бактерий и увеличение количества патобионтов (рис. 4).

Jørgensen S. и др. исследовали состав кишечной микробиоты у 44 пациентов с ОВИН, 45 пациентов с ВЗК и 263 здоровых людей из контрольной группы. Высокое альфа-разнообразие с большим количеством микробных видов примерно одинаковой численности было зарегистрировано у здоровых людей, микробиота пациентов с ОВИН характеризовалась сниженным альфа-разнообразием, коррелирующим с повышенным уровнем липополисахарида плазмы (ЛПС), маркера микробной транслокации, повышенным уровнем растворимых (s)CD14 и sCD25 (биомаркеров иммунной активации) и сниженным уровнем IgA в сыворотке [22].

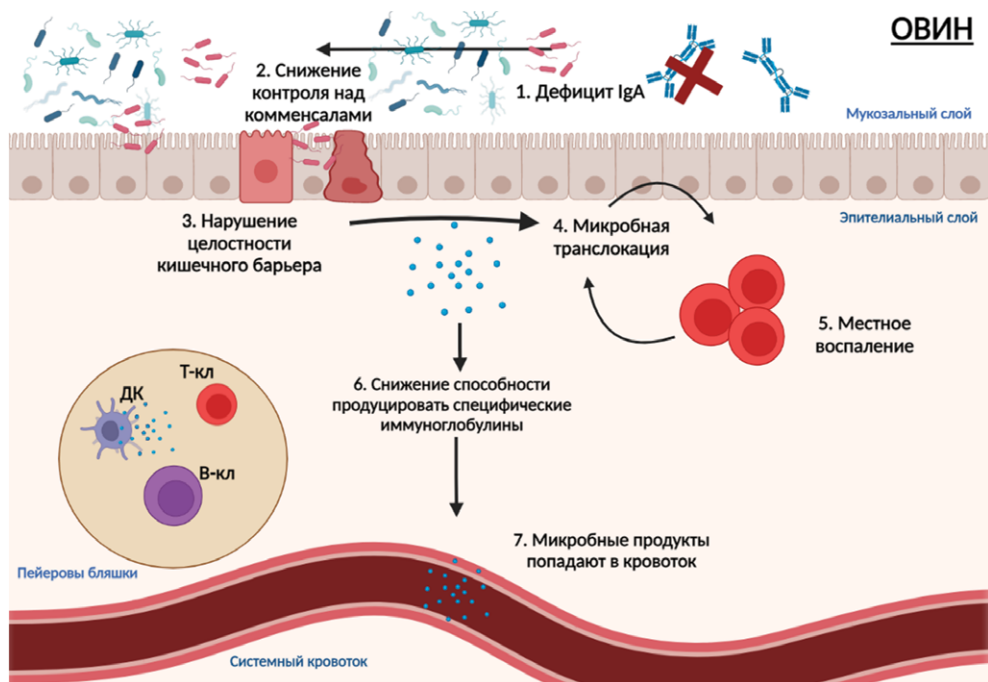


Рис. 4. Измененный состав микробиоты при ОВИН (адаптировано из статьи Berbers Roos-Marijn et al., 2017) [21]

Fig. 4. Altered composition of the microbiota in CVID (adapted from the paper of Berbers Roos-Marijn et al., 2017) [21]

Пациенты с ОВИН часто имеют низкий уровень IgA или его отсутствие. В отсутствие IgA состав микробиома может изменяться, количество бактерий, оказывающих провоспалительный эффект, – увеличиваться, при этом таксоны конкурируют с полезными комменсалами, обладающими противовоспалительными эффектами.

Влияние дефицита IgA на микробиом ОВИН является многонаправленным. Во-первых, низкий уровень IgA связан с повышенной восприимчивостью к вирусной инфекции в ЖКТ, приводя к воспалению слизистой оболочки. Высокая инфекционная нагрузка может нарушать нормальную кишечную флору, а рецидивирующие инфекционные заболевания могут привести к повреждению кишечного эпителия, приводя к усилению микробной транслокации. Во-вторых, нарушение контроля кишечного микробиома и повышенная экспансия определенных групп бактерий могут привести к системной иммунной активации. В-третьих, из-за противовоспалительного действия IgA, гипогаммаглобулинемия может привести к усилению местного воспаления в ответ на комменсальные бактерии. Благодаря этим функциям дефицит IgA не только приводит к изменениям в составе микробиома и увеличению риска микробной транслокации, но также может непосредственно приводить к локальному воспалению слизистой оболочки.

В норме наличие IgA в просвете кишечника важно для поддержания разнообразия микробиома (рис. 4). IgA способствует элиминации патобионтов и придает иммунологическую толерантность комменсалам. При отсутствии воспаления и наличия неповрежденного кишечного барьера ограничивается микробная транслокация.

Таким образом, дефицит селективного IgA связан с более высоким риском инфекционных осложнений со стороны ЖКТ, приводя к нарушению целостности кишечного барьера, позволяя проникать большему количеству бактерий и бактериальных продуктов (рис. 3).

Кроме того, недавнее исследование Fadlallah с соавторами продемонстрировало, что IgG здоровых людей распознают микробиоту пациентов с ОВИН гораздо менее эффективно, чем микробиоту здоровых людей, таким образом, заместительная терапия IgG может быть недостаточной для ограничения нарушения регуляции и/или транслокации микробиоты при ОВИН [23]. В другом исследовании Jason R. Catanzaro у пациентов с дефицитом селективного IgA наблюдался измененный состав кишечной микробиоты по сравнению со здоровым контролем, несмотря на секрецию компенсаторного IgM в просвет кишечника [24].

■ МИКРОБИОМ ЖКТ ПРИ ДРУГИХ НОЗОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМАХ ПИД

Дисбаланс микробиоты, дисбиоз, может быть следствием воспалительного процесса и приводить к прогрессированию дифференцировки эффекторных клеток, что сопровождается воспалением и аутоиммунными реакциями. Предполагаемые механизмы между различными клетками, медиаторами цитокинов и иммуноглобулинами, лежащие в основе ассоциации между микробиомом ЖКТ и воспалительными процессами при различных нозологических формах ПИД, продемонстрированы на рис. 5.

Многочисленные исследования о связи различных нозологических форм ПИД и изменений в составе микробиоты ЖКТ представлены в литературных источниках.

У пациентов с ПИД группы иммунной дисрегуляции часто наблюдаются аутоиммунные проявления, отмечается повышенная восприимчивость к инфекциям, что в конечном итоге приводит к развитию мультиорганный воспаления. Foxp3 является основным фактором транскрипции, связанным с развитием и функцией Treg-клеток. Мутации или делеции гена Foxp3 приводят к синдрому IPeX у людей. Синдром IPeX обычно ассоциируется с экземой, тяжелой энтеропатией, диабетом I типа, тиреоидитом, гемолитической анемией и тромбоцитопенией. На функцию Treg-клеток могут влиять и другие генетические дефекты в генах LRBA, CTLA4, DOCK8, MALT1, приводя к IPeX-подобным состояниям. Wu W. с соавторами описали положительный эффект лечения фекальной трансплантации микробиоты (ФМТ) у пациента с IPeX-синдромом [29].

Микроорганизмы кишечной микробиоты могут влиять на баланс клеток Th17/Treg, метаболиты, продуцируемые кишечной микробиотой, особенно SCFAs, влияют на индукцию Tregs. Таким образом, необходимо изучение влияния состава микробиома кишечника на патогенез иммунодефицитов с иммунной дисрегуляцией [26].

Исследования по анализу микробиоты кишечника с различными формами ПИД проводятся во всем мире. В исследовании Sokol H. и соавт. сравнивали состав фекальной микробиоты пациентов с ВЗК и 3 нозологическими формами ПИД: ХГБ (11 образцов), дефицитом X-сцепленного ингибитора апоптоза (XIAP) (7 образцов)

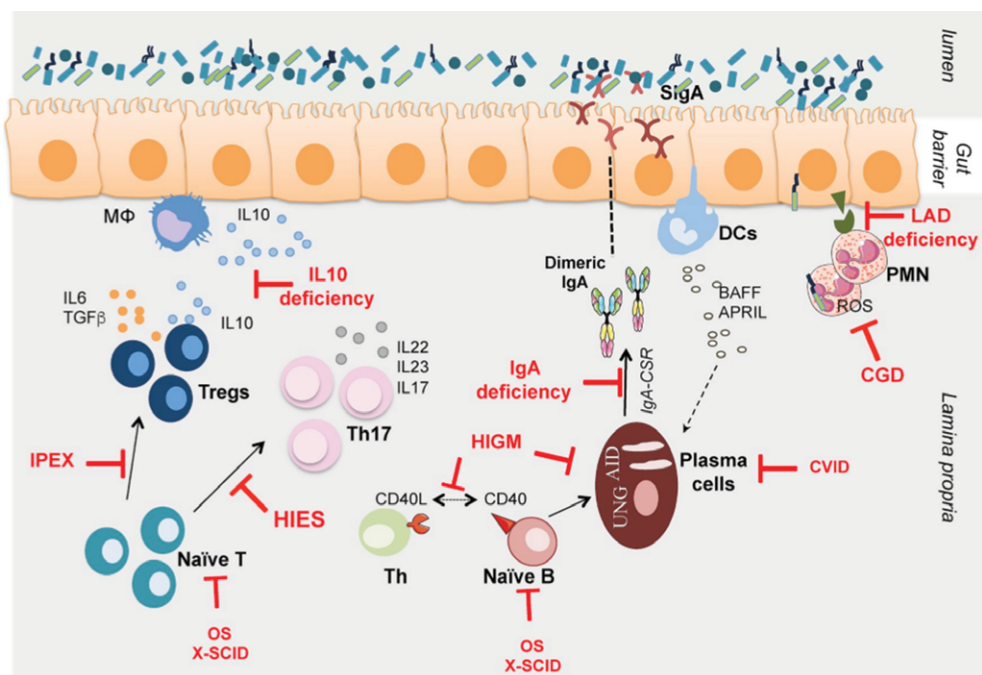


Рис. 5. Механизм иммунного ответа при различных нозологических формах ПИД [25]
Fig. 5. The mechanism of the immune response in various nosological forms of PID [25]

и частичным дефицитом домена тетраатрикопептидных повторов 7A (TTC7A) (7 образцов), сравнивая их состав микробиоты с помощью 16S секвенирования с микробиомом пациентов без ВЗК (18 образцов) и здоровыми людьми (23 образца). Количественный состав и разнообразие микробиоты ЖКТ при данных нозологических формах ПИД характеризовались специфическими для заболевания изменениями с резким увеличением Proteobacteria из семейства Enterobacteriaceae в группе TTC7A; повышенной численностью бактерий Bacteroidetes при ХГБ; увеличением относительного количества бактерий семейства клостридий при генетической поломке в гене XIAP. У пациентов с ХГБ также наблюдалось повышенное количество Ruminococcus gnavus, микроорганизма, который также был связан с болезнью Крона подвздошной кишки у детей [27].

В исследовании Ai-Juan Xue с соавторами оценивали микробиоту кишечника у 17 пациентов с мутациями IL10RA (группа IL10RA), 17 пациентов с БК у детей и 26 здоровых детей. Как у пациентов с мутациями IL10RA, так и у пациентов с целиакией наблюдалось снижение разнообразия кишечного микробиома. Относительная численность Firmicutes была существенно увеличена в группе IL10RA ($p=0,02$). При дальнейшем сравнении относительной распространенности таксонов между пациентами с мутациями IL10RA и здоровыми детьми наблюдали изменения по 13 таксонам между группами [28]. Степень кишечного дисбиоза (рассчитанная на основе относительной численности пяти таксонов на уровне порядка: Lactobacillales, Micrococcales,

Veillonellaceae, Clostridiales и Selenomonadales) напрямую связана с тяжестью заболевания [28].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиота кишечника оказывает значительное влияние на иммунитет и метаболизм организма человека. Иммунный гомеостаз достигается и поддерживается частично благодаря комплексному взаимодействию между микробиотой кишечника и иммунной системой ЖКТ.

Изучение микробиома у пациентов с ПИД предоставило важную информацию о том, как микробные взаимодействия и сосуществование способствуют патогенезу заболевания. Микробные сообщества кишечника у пациентов с ПИД значительно отличаются от здоровых по разнообразию и составу. Одной из объединяющих характеристик микробиома при ПИД является снижение разнообразия бактерий кишечника.

Некоторые таксоны в желудочно-кишечном тракте способствуют гомеостазу, защищая от инфекций различными способами. Кишечные комменсалы непосредственно ингибируют рост патогенных бактерий, активируют врожденные иммунные механизмы для подавления конкурирующих микробов, переносят комменсалы и стимулируют реакции, поддерживающие целостность эпителиального барьера. Их изменение может лежать в основе aberrantных иммунных реакций при ПИД. В дополнение к дефициту полезных видов микробиота при ПИД также характеризуется преобладанием бактерий с провоспалительными эффектами.

Другой общей чертой исследований у пациентов с ПИД является транслокация ЛПС в воспалительных очагах и в системном кровотоке. Бактериальный ЛПС связан с хронической иммунной активацией и иммунной дисрегуляцией.

В перспективе исследования на более крупных группах пациентов могут определить, связаны ли конкретные генетические дефекты при ПИД с определенными паттернами состава микробиома.

Традиционный скрининг и лечение заболеваний могут быть значительно улучшены путем мониторинга микробного состава и манипулированием состава микрофлоры кишечника. Моделирование микрофлоры кишечника с помощью микробной замены, путем использования пробиотиков и/или диеты может помочь снизить риски развития воспаления и канцерогенной активности.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A. et al. (2021) The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: An Interim Update by the IUIS Committee. *J Clin Immunol*, vol. 41, no 3, pp. 666–679. doi: 10.1007/s10875-021-00980-1.
2. Zhu R., Lang T., Yan W. et al. (2021) Gut Microbiota: Influence on Carcinogenesis and Modulation Strategies by Drug Delivery Systems to Improve Cancer Therapy. *Adv Sci (Weinh)*, vol. 8, no 10. doi:10.1002/advs.202003542
3. Castagnoli R., Pala F., Bosticardo M. et al. (2021) Gut Microbiota-Host Interactions in Inborn Errors of Immunity. *Int J Mol Sci*, vol. 22, no 3. doi: 10.3390/ijms22031416.
4. Stoma I.O., Karpov I.A. *Human microbiome*. Minsk: DoktorDizajn, 2018; 122 p. (in Russian)
5. Knights D., Lassen K., Xavier R. (2013) Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*, vol. 62, no 10, pp. 1505–1510.
6. Petersen C., Round J.L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.*, vol. 16, pp. 1024–1033.
7. DeGruttola A.K. (2016) Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis.*, vol. 22(5), pp. 1137–1150.
8. Yuhao J. et al. (2020) Crosstalk Between Gut Microbiota and Innate Immunity and Its Implication in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, vol. 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00282

9. Ni J., Wu G.D., Albenberg, L. et al. (2017) Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, vol. 14, no 10, pp. 573–584. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.88>
10. Kumrah R., Vignesh P., Patra P., et al. (2019) Genetics of severe combined immunodeficiency. *Genes & diseases*, vol. 7(1), pp. 52–61. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.004>
11. Lane J.P., Stewart C.J., Cummings S.P. et al. (2015) Gut microbiome variations during hematopoietic stem cell transplant in severe combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 135(6), pp. 1654–1656. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.024>
12. Lane J.P., Stewart C.J., Cummings S.P. et al. (2016) Functional changes in gut microbiota during hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 138(2), pp. 622–625.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.019>
13. Yu J., Sun H., Cao W. et al. (2020) Applications of gut microbiota in patients with hematopoietic stem-cell transplantation. *Exp. Hematol. Oncol*, vol. 9. doi: 10.1186/s40164-020-00194-y.
14. Fredricks D.N. (2019) The gut microbiota and graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*, vol. 129(5), pp. 1808–1817. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI125797>
15. Bashir A., Miskeen A.Y., Hazari Y.M. et al. (2016) Fusobacterium nucleatum, inflammation, and immunity: the fire within human gut. *Tumour Biol.*, vol. 37, pp. 2805–2810. doi: 10.1007/s13277-015-4724-0.
16. Chen Y., Zhao Y., Cheng Q. et al. (2015) The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease. *Journal of immunology research*. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/145859>
17. Zeiser R., Socié G., Blazar B.R. et al. (2016) Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation. *Br J Haematol.*, vol. 175, pp. 191–207. doi: 10.1111/bjh.14295.
18. Ohya T., Yanagimachi M., Iwasawa K. et al. (2017) Childhood-onset inflammatory bowel diseases associated with mutation of Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *World J. Gastroenterol*, vol. 23, pp. 8544–8552. doi: 10.3748/wjg.v23.i48.8544]
19. Zhang L., Li Y.Y., Tang X. et al. (2019) Faecal microbial dysbiosis in children with Wiskott-Aldrich syndrome. *Scand. J. Immunol*, vol. 91. doi: 10.1111/sji.12805
20. Hartono S., Ippoliti M. R., Mastroianni M. et al. (2019). Gastrointestinal Disorders Associated with Primary Immunodeficiency Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, vol. 57(2), pp. 145–165. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8689-9>
21. Berbers R.M., Nierkens S., van Laar J.M. et al. (2017) Microbial Dysbiosis in Common Variable Immune Deficiencies: Evidence, Causes, and Consequences. *Trends in immunology*, vol. 38(3), pp. 206–216. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.11.008>
22. Jørgensen S.F., Trøseid M., Kummen M. et al. (2016) Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunol*. vol. 9, pp. 1455–1465. doi: 10.1038/mi.2016.18.
23. Fadlallah J., Sterlin D., Fieschi C. et al. (2019) Synergistic convergence of microbiota-specific systemic IgG and secretory IgA. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 143(4), pp. 1575–1585.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.036>
24. Catanzaro J.R., Strauss J.D., Bielecka A. et al. (2019) IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Sci Rep*, vol. 9. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49923-2>
25. Pellicciotta M., Rigoni R., Falcone E.L. et al. (2019) The microbiome and immunodeficiencies: Lessons from rare diseases. *Journal of autoimmunity*, vol. 98, pp. 132–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.008>
26. Chen P., Tang, X. (2021) Gut Microbiota as Regulators of Th17/Treg Balance in Patients With Myasthenia Gravis. *Frontiers in immunology*, vol. 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803101>
27. Sokol H., Mahlaoui N., Aguilar C. et al. (2019) Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease associated with primary immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 143(2), pp. 775–778. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.021>
28. Xue A. J., Miao S. J., Sun H. et al. (2020) Intestinal dysbiosis in pediatric Crohn's disease patients with *IL10RA* mutations. *World journal of gastroenterology*, vol. 26, no 22, pp. 3098–3109. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i22.3098>
29. Wu W., Shen N., Luo L. et al. (2021) Fecal microbiota transplantation before hematopoietic stem cell transplantation in a pediatric case of chronic diarrhea with a FOXP3 mutation. *Pediatrics and neonatology*, vol. 62, no 2, pp. 172–180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2020.11.003>

<https://doi.org/10.34883/Pl.2022.11.3.011>
УДК 616.992.282



Казак В.И.✉, Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Инвазивные грибковые инфекции: эпидемиология и диагностика (обзор литературы)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Казак В.И. – обзор литературы; Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я. – редактирование.

Подана: 21.07.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: vk250998@gmail.com

Резюме

Грибковые инфекции характеризуются высоким уровнем распространенности среди людей, и их проявления могут быть от легких поверхностных поражений кожи и ногтевых пластин до опасных для жизни оппортунистических инвазивных микозов. Инвазивные грибковые инфекции (ИГИ) характеризуются высокой заболеваемостью и смертностью у пациентов с ослабленным иммунитетом. Среди ИГИ кандидоз продолжает оставаться основной причиной инвазивных грибковых инфекций кровотока, в то время как аспергиллез и мукоормикоз чаще встречаются у онкогематологических пациентов и реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), а также внутренних органов. Ранняя диагностика и своевременная противогрибковая профилактика являются ключевыми факторами для предотвращения развития ИГИ. Диагностика микозов представляет собой определенную сложность, поскольку клинические и рентгенологические данные часто неспецифичны; объем образца, необходимый для обеспечения хорошей чувствительности анализа, зачастую бывает недостаточен; культуральные методы имеют ограниченную чувствительность и эффективность; забор материала для проведения гистопатологического исследования может представлять опасность для здоровья и жизни пациентов. Для повышения качества диагностики и терапии грибковых инфекций необходимо использование методов, характеризующихся высокой чувствительностью, специфичностью и не требующих длительного выполнения исследования. Число случаев ИГИ растет, поэтому появление новых высокоэффективных методов диагностики на ранних стадиях инфекции может стать одним из путей снижения уровня заболеваемости и смертности при данных видах инфекций. Цель данного обзора – осветить современные подходы и достижения, связанные с диагностикой инвазивных грибковых инфекций.

Ключевые слова: инвазивные грибковые инфекции, инвазивный кандидоз, инвазивный аспергиллез, мукоормикоз, иммуносупрессия

Kazak V.✉, Tchernovetskiy M., Skapavets K.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Invasive Fungal Infections: Epidemiology and Diagnosis (Literature Review)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kazak V. – literature review; Tchernovetskiy M., Skapavets K. – editing.

Submitted: 21.07.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: vk250998@gmail.com

Abstract

Fungal infections are highly prevalent in humans and may be manifested from mild superficial skin and nail lesions to life-threatening opportunistic invasive fungal infections. Invasive fungal infections (IFIs) are characterized by high morbidity and mortality in immunocompromised patients. Among IFIs, candidiasis continues to be the main cause of invasive fungal infections of the bloodstream, while aspergillosis and mucormycosis are more common in hematological patients and recipients of hematopoietic stem cell transplants (HSCT), as well as internal organs. Early diagnosis and timely antifungal prophylaxis are key to preventing the development of IFIs. Diagnosis of fungal infections is difficult because clinical and radiological findings are often nonspecific; the sample volume required to provide good assay sensitivity is often insufficient; cultural methods have limited sensitivity and efficiency; the collection of material for histopathological examination can be health- and life-threatening for patients. To improve the quality of diagnosis and therapy of fungal infections, it is necessary to use methods that are characterized by high sensitivity, specificity and do not require long-term study. The number of cases of IFIs is growing, so the emergence of new highly effective diagnostic methods in the early stages of infection can be one of the ways to reduce the incidence and mortality in these types of infections. The purpose of this review is to highlight modern approach and recent advances in the diagnosis of invasive fungal infections.

Keywords: invasive fungal infections, invasive candidiasis, invasive aspergillosis, mucormycosis, immunosuppression

■ ВВЕДЕНИЕ

Грибковые инфекции характеризуются высоким уровнем распространенности среди людей, и их проявления могут быть от легких поверхностных инфекций кожи и ногтей до опасных для жизни оппортунистических инвазивных инфекций [1]. Данным заболеванием страдают около одного миллиарда человек во всем мире с летальным исходом в более чем миллионе случаев [2]. Изменения в спектре грибковых инфекций, связанные с новыми факторами риска и появлением резистентных грибов, подчеркивают необходимость постоянного обновления знаний о диагностике и эпидемиологии грибковых инфекций. Инвазивные грибковые

инфекции (ИГИ) характеризуются высокой заболеваемостью, представляют большую опасность для пациентов с ослабленным иммунитетом, включая пациентов с нейтропенией, вирусом иммунодефицита человека, хронической иммуносупрессией, ожогами и сахарным диабетом, а также пациентов, принимающих антибиотики широкого спектра действия [3]. Другие факторы, влияющие на заболеваемость и смертность пациентов с ИГИ, – это отсутствие ранней диагностики, а также своевременной профилактики и адекватного противогрибкового лечения [4, 5].

Надлежащая диагностика грибковых инфекций имеет решающее значение в связи с высокими показателями заболеваемости и смертности, а также значительным экономическим бременем, связанным с лечением этих заболеваний. Распознавание ИГИ и дифференциация от других инфекций с аналогичными клиническими проявлениями представляют определенную сложность, что может привести к диагностической ошибке, которая не только повлияет на состояние здоровья отдельных пациентов, но и повлечет за собой нерациональное использование противогрибковых препаратов и рост лекарственной устойчивости к ним. Таким образом, существует потребность в улучшении диагностического тестирования и лечения микозов [6].

■ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Эпидемиология грибковых инфекций постоянно меняется, что имеет большое значение для их диагностики и лечения. Число этих инфекций остается достаточно высоким, особенно у новорожденных, пациентов отделения интенсивной терапии (ОИТ), лиц с внутривенными катетерами, реципиентов трансплантатов органов и тканей, людей, получающих различные виды иммунодепрессантов или противоопухолевой химиотерапии. Возбудители ИГИ попадают в организм ингаляционным и контактно-бытовым путями, при приеме воды и пищи, а также при медицинских манипуляциях (различные виды инъекций, катетеризация сосудов и полостей организма).

Большинство грибов (микромикетов) рода *Candida* существуют в качестве сапрофитов на коже, в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и в области гениталий; выявляются при посевах со слизистой оболочки ЖКТ у 30–50% здоровых людей и со слизистой оболочки гениталий у 20–30% здоровых женщин. Но в условиях повреждения цитостатическими препаратами колонизированные микромикетами слизистые оболочки ЖКТ и мочевыводящих путей иммунокомпрометированных пациентов могут стать источником диссеминации микрофлоры и привести к развитию тяжелой грибковой инфекции [7].

Инвазивный кандидоз (ИК) продолжает оставаться наиболее частой причиной ИГИ, но наблюдается выраженный этиологический переход от *Candida albicans* к другим видам *Candida*, таким как *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, или полирезистентным видам *Candida auris*, что обусловлено широким применением противогрибковой профилактики с использованием лекарственных препаратов группы азолов [8]. По меньшей мере 17 видов рода *Candida* вызывают заболевания человека, но более 95% инвазивных заболеваний вызываются пятью основными патогенами: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* и *C. krusei* [9].

Инвазивный аспергиллез (ИА) чаще встречается у онкогематологических пациентов и реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [10]. Было выявлено, что для реципиентов трансплантатов солидных органов основной причиной инфекций являются грибы рода *Candida* (53%). Удельный вес

других грибов существенно ниже: *Aspergillus* spp. – 19%, *Mucormycosis* – 2%. В то же время для реципиентов ТГСК характерно другое распределение микромицетов: *Aspergillus* spp. – 43%, *Candida* spp. – 28%, *Mucormycosis* – 8%. Частота возникновения инвазивного аспергиллеза у реципиентов аллогенной ТГСК выше, чем у реципиентов аутологичной ТГСК (15% против 2%) [11].

Большинство изолятов *Aspergillus* spp., вызывающих инвазивный аспергиллез, часто относятся к *Aspergillus fumigatus*, с уровнем выделения до 92%, за которым следуют *A. favus*, *A. niger* и *A. terreus* [12]. После *Aspergillus* spp. грибы родов *Rhizopus* и *Mucor* являются следующими наиболее распространенными возбудителями у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, реципиентов ТГСК и трансплантатов паренхиматозных органов. Кроме того, инфекции, вызванные данными патогенами, все чаще выявляются у лиц с сахарным диабетом, а также в результате перенесенных травм или ятрогенных повреждений [13]. Наиболее часто встречаемые патогены рода *Rhizopus* – *R. microsporus*, *R. stolonifer*, *R. oryzae* [14], а среди грибов рода *Mucor* преобладают *M. ramosissimus*, *M. circinelloides*, *M. indicus* [15].

Существует ряд этиологических отличий в возникновении ИГИ в учреждениях здравоохранения различных регионов мира, связанных с множеством факторов: образ жизни; вид основного заболевания; уровень диагностики и качество оказания медицинской помощи, и в частности хирургических услуг. Смертность при инвазивных микозах остается высокой и варьирует от 30% при инвазивном кандидозе до 90–100% при некоторых клинических формах мукормикоза [8].

■ ДИАГНОСТИКА

Ранняя диагностика и своевременная противогрибковая профилактика являются ключевыми факторами для предотвращения развития инфекций, вызванных патогенными грибами. Диагностика ИГИ является сложной, поскольку клинические и рентгенологические данные часто неспецифичны; объем образца, необходимый для обеспечения хорошей чувствительности, зачастую бывает недостаточен; культуральные методы имеют ограниченную чувствительность и эффективность; забор материала для проведения гистопатологического исследования может представлять опасность для здоровья и жизни пациентов. Недавно внедренные молекулярные и серологические методы анализа, направленные, соответственно, на выявление дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) грибов, а также на определение антигена галактоманнана (GMN) и 1,3-β-D-глюкана (BDG), позволили значительно улучшить диагностику ИГИ [16].

Микроскопия, культуральные методы

Микроскопия в сочетании с традиционными культуральными методами диагностики грибковых инфекций считается «золотым стандартом» диагностики данного вида патологии человека [17].

Микроскопия нативного и гистологически обработанного материала представляет собой быстрый, доступный и относительно экономичный метод диагностики. Прямое исследование нативного биоматериала подразумевает использование различных красителей для проведения световой, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. Положительный результат прямой микроскопии дрожжевых

клеток или филаментозных структур из стерильных локусов следует считать значимым, даже если лаборатория не имеет возможности последующего культивирования грибковой микрофлоры. Чувствительность метода микроскопии невысока, и не всегда возможна видовая идентификация грибов, так как некоторые грибы имеют сходные морфологические характеристики.

Гистопатологическое исследование (ГИ) помогает дифференцировать разные виды плесени с точностью до 80% и требует микробиологического посева для их подтверждения [16]. Терапия микозов определяется чувствительностью изолятов к противогрибковым препаратам. ГИ является целесообразным в диагностике инвазивного аспергиллеза легких, но из-за риска кровотечения и других осложнений во время инвазивного метода исследования не всегда есть возможность выполнения биопсии ткани легкого [18].

Эффективность микроскопии зависит от типа биоматериала, источника и качества исследуемого образца, а также от опыта микробиолога. Следовательно, микроскопическое исследование может быть менее чувствительным, чем посев, поэтому отрицательный результат не исключает наличия грибковой инфекции.

Культуральное микробиологическое исследование представляет собой выделение культуры (штаммов) возбудителя из биоматериала. Проведение гемокультурального анализа принято считать эталоном данного метода диагностики, при этом частота выявления микромицетов в крови колеблется в диапазоне от 21 до 71% (наиболее низкие показатели – у детей и новорожденных) [16]. Требующее продолжительного времени, микробиологическое выделение штаммов грибов на питательных средах не является оптимальным для ранней диагностики инвазивных микозов. Более чем у трети пациентов с кандидозом гемокультура негативна, а в случаях наличия роста микромицетов последующая видовая идентификация не всегда возможна в течение 48–72 часов. В результате посева крови при диссеминированном кандидозе можно пропустить $\geq 50\%$ пациентов с документально подтвержденным заболеванием, что может повлечь за собой позднее назначение адекватного лечения.

На отрицательные результаты посева крови при кандидозе могут повлиять несколько факторов: низкое количество клеток *Candida spp.*; внутриклеточная абсорбция *Candida spp.* в лейкоцитах; сниженное количество крови, взятой в каждой пробе (особенно у детей младшего возраста и новорожденных); профилактическое применение антимикотиков или проведение эмпирической противогрибковой терапии. При инвазивном аспергиллезе выявление грибковых гемокультур имеет место в единичных случаях. Обнаружение таких мицелиальных грибов, как *Rhizopus spp.* и *Mucor spp.*, чаще происходит при микроскопии исследуемых субстратов, реже – при посеве биоматериала. Возбудитель очень редко выделяют в посевах крови даже при диссеминированном мукормикозе.

Проведение культурального исследования биоматериала при инвазивных микозах требует определенных временных параметров – от 1–5 суток до появления роста гемокультур во флаконе с биоматериалом в случае дрожжевой микрофлоры до 4–7 и более суток при наличии плесневых микромицетов. Последующая видовая идентификация грибов занимает еще 1–2 суток при дрожжевой и около 4–7 суток – при плесневой микрофлоре. В некоторых случаях выделения так называемых медленно растущих микромицетов длительность инкубирования нативного материала может превышать 2–3 недели.

Несмотря на ограниченную чувствительность, культуральные методы диагностики грибковых инфекций остаются одними из основных методов диагностики и лечения микозов, поскольку позволяют выявить этиологию на уровне рода и вида и дают возможность определения чувствительности грибов к антимикотическим препаратам [19].

Серологические методы

К серологическим методам диагностики инвазивных грибковых инфекций относят определение грибковых антигенов, входящих в состав стенки гриба, а также соответствующих специфических антител, которые впоследствии используют для скрининга бессимптомных пациентов из группы высокого риска и для диагностики пациентов с симптомами. Среди грибковых антигенов выделяют:

- 1,3-β-D-глюкан.

1,3-β-D-глюкан (BDG) является компонентом внешней клеточной стенки грибов, включая грибы родов *Candida* и *Aspergillus*, и этот компонент выделяется в кровоток при ИГИ [20]. Однако BDG отсутствует у пациентов с мукормикозом, поскольку грибы, вызывающие это заболевание, не продуцируют данный полисахарид. При клиническом применении методы измерения 1,3-β-D-глюкана дают информацию, аналогичную той, что получают с помощью других тестов на обнаружение антигена, но не позволяют различать грибы (например, *Aspergillus* или *Candida*). Дополнительные ограничения теста на уровень BDG связаны с интерференцией с β-глюканами, встречающимися в разных инфузионных жидкостях, пищевых продуктах и других биологических материалах. Исследования с использованием различных модификаций BDG показали чувствительность теста в диапазоне 55–100% при специфичности в 87–93%, положительном прогностическом значении (PPV) 40–84% и отрицательном прогностическом значении (NPV) 75–100% [21]. Из-за различий в диагностической чувствительности и специфичности, трудоемкости проведения анализа и стоимости исследования изолированное тестирование уровня BDG не является на сегодняшний день рекомендуемым исследованием для диагностики ИГИ [22]. Однако его применение может быть эффективно либо в качестве дополнения к другим диагностическим методам, либо в качестве косвенного параметра для мониторинга инвазивных грибковых инфекций [16];

- галактоманнан.

Галактоманнан (GMN) представляет собой полисахарид, который состоит из основной цепи маннозы и различного количества боковых цепей галактофурана и составляет основную часть клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*. Галактоманновый тест совместно с клиническими и радиологическими исследованиями дополняет диагностику инвазивного аспергиллеза. Определение диагностически значимого уровня (индекса) галактоманнана в сыворотке крови и бронхоальвеолярном содержимом у онкогематологических пациентов свидетельствует о вероятном ИА. Концентрация циркулирующего галактоманнана коррелирует с наличием очагов в легких и смертностью. Данный показатель отражает также степень поражения органов и тканей, поэтому может использоваться для контроля эффективности противогрибковой терапии [23]. Однако GMN не является исключительно специфичным для грибов рода *Aspergillus*, так как описана перекрестная реактивность с полисахаридами других плесневых грибов, таких как, например, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Как следствие

этого, требуется проведение (в качестве подтверждения) выделения возбудителя с последующей родовой и при возможности видовой идентификацией. Другой причиной так называемого ложноположительного результата диагностики ИА путем выявления GMN в исследуемом биоматериале может быть присутствие в анализируемом образце экзогенно продуцируемого галактоманнана, который может попасть в организм человека в составе некоторых препаратов, например, в виде β -лактамных антибиотиков (таких как пиперациллин/тазобактам или амоксициллин/клавуланат), при производстве которых имеет место этап ферментации исходного сырья с использованием *Aspergillus niger* или *Aspergillus terreus* [24]. Измерение уровня галактоманнана можно проводить различными методами, при этом преимущественно используется иммуноферментный анализ (ИФА), характеризующийся более высокой чувствительностью по сравнению с альтернативно применяемым иммунохроматографическим методом диагностики. В отдельных исследованиях было показано, что, с учетом используемых пороговых значений и групп пациентов, чувствительность ИФА GMN может колебаться в диапазоне от 65 до 97% при варьировании специфичности от 78 до 100% [25];

- маннановый антиген (Mn) и антиманнановое антитело (a-Mn).

Комбинацию тестирования на наличие маннанового антигена и антиманнановых антител (Mn/a-Mn) принято считать перспективным подходом в части диагностики инвазивных инфекций, вызванных преимущественно грибами *Candida albicans* [26]. К настоящему времени имеются соответствующие коммерческие тест-системы на основе реакции непрямой иммунофлюоресценции. Данный тест является одним из применяемых методов диагностики инвазивного кандидоза у реципиентов ТГСК, трансплантации внутренних органов и тканей, а также пациентов отделений интенсивной терапии. У пациентов с ИГИ, обусловленными другими видами грибов рода *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* и *C. krusei*), результаты могут быть также положительными, хотя диагностическое значение индекса оптической плотности ниже, чем при кандидозе, вызванном *C. albicans*. Данный метод может применяться для мониторинга течения инфекции у пациентов с соответствующим инвазивным кандидозом, вызванным отдельными видами кандид, так как индексы оптической плотности имеют тенденцию к снижению на фоне адекватной противогрибковой терапии. Обнаружение маннанового антигена может быть эффективно в сыворотке крови при гепатолиенальном кандидозе и кандидозном менингите, при которых гемокультура редко бывает положительной [27]. Диагностическая чувствительность и специфичность теста определения комбинации Mn/a-Mn составляют 83% и 86% соответственно. Диагностическая чувствительность зависит от видоспецифичности *Candida* spp. Например, данный показатель составляет 100% при *Candida albicans*, 50% при *Candida krusei* и лишь 40% при *Candida parapsilosis* [28]. В настоящее время применение этого анализа ограничено из-за ряда недостатков, таких как кратковременное содержание *Candida* Mn в сыворотке крови и наличие ложноположительных результатов в части диагностики инвазивных кандидозов, обусловленных частой колонизацией кандидами различных локусов организма человека [29].

Молекулярно-генетические методы идентификации ИГИ

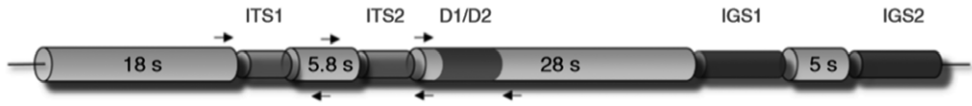
Общеизвестно, что традиционные методы диагностики инвазивных грибковых заболеваний являются затратными по времени. В связи с этим значительно сокращенный временной параметр выдачи результата исследования, достигаемый

с помощью молекулярных методов исследований, имеет существенное значение, особенно в условиях оказания неотложной медицинской помощи. В отличие от преимущественно субъективных по своей сути классических микробиологических методов диагностики (включая микроскопию нативного, культурально выделенного, а также гистологически обработанного биологического материала), молекулярно-генетические исследования являются объективными, высокочувствительными и эффективными, а также требуют меньшего количества исследуемого материала и времени. На сегодняшний день уже доступны для использования ряд специфических диагностикомов, предназначенных для обнаружения одного или нескольких грибковых патогенов методом амплификационного анализа в варианте полимеразной цепной реакции (ПЦР) [30].

ПЦР является центральным компонентом многих молекулярных методов исследования в качестве основного диагностического подхода либо в качестве одного из предварительных этапов анализа. Данный метод позволяет идентифицировать ДНК патогенов, вызывающих ИГИ, из крови, сыворотки, плазмы, мочи, кала, мокроты и других биологических жидкостей человека. Специфический характер реакции ПЦР позволяет использовать ее непосредственно на клинических образцах, содержащих большое количество нуклеиновой кислоты хозяина, без получения чистых культур грибов *in vitro*. Ограничением использования метода ПЦР для диагностики ИГИ является обычно низкое количество грибковой ДНК в клинических образцах по сравнению с вирусной или бактериальной нагрузкой. Более чувствительным методом определения ИГИ является количественная ПЦР в режиме реального времени, где приборы графически отображают результат в режиме реального времени по мере прохождения циклов амплификации. Выход обычно обнаруживается с помощью детекции флуоресценции ДНК патогенов, которая может быть достигнута благодаря добавлению в реакцию зонда, специфичного для целевой последовательности ДНК в ампликоне. Для создания мультиплексных реакций, с помощью которых возможно детектировать одновременно несколько патогенов, необходимо использовать несколько зондов [31].

Использование видо- или родоспецифичной ПЦР-реакции направлено на определение узкого спектра патогенов и может применяться только в случае присутствия доказательств наличия инфекции, вызванной определенным патогеном или их группой. В свою очередь, использование пангрибковой ПЦР в режиме реального времени позволяет неспецифически обнаруживать и количественно определять всю ДНК грибов, присутствующую в клиническом образце. Благодаря широкому спектру праймеров и зондов анализ позволяет обнаруживать все грибковые патогены. Этот подход позволяет идентифицировать редко встречающиеся патогены и обнаруживать некультивируемые или даже неизвестные возбудители грибкового происхождения. Для выявления патогенов, не включенных в набор специфических тестов, или в случаях, когда клинические данные не помогают сузить число возможных патогенов, пангрибковая ПЦР используется для постановки верифицированного диагноза [32].

Методы определения ДНК с помощью пангрибковой ПЦР обычно предполагают использование в качестве мишени рибосомальной ДНК (рДНК) грибов. Гены рРНК грибов организованы как повторяющаяся единица, структурно состоят из последовательности, кодирующей 18S рРНК (для малой субъединицы рибосомы),



Последовательность ДНК, кодирующая рибосомальные РНК грибов
DNA sequence encoding fungal ribosomal RNA

внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1), последовательности, кодирующей 5.8S рРНК, внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2), последовательности, кодирующей 28S рРНК (для большой субъединицы рибосомы), межгенной последовательности 1 (IGS1), последовательности, кодирующей 5S рРНК, и межгенной последовательности 2 (IGS2). Последовательности 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 и 28S транскрибируются как одна РНК, которая затем подвергается сплайсингу для удаления областей ITS1 и ITS2 для сборки с 5S рРНК в полную рибосому, состоящую из 18S, 5.8S, 28S, 5S и различных белков. Области ITS1 и ITS2 составляют последовательность ITS, длина которой обычно составляет ~600 пар нуклеотидов (п. н.). Область D1/D2 имеет одинаковую длину. Сайты прайминга для ПЦР показаны черными стрелками и могут использоваться в различных комбинациях. Последовательность 5S транскрибируется отдельно и окружена двумя участками IGS, которые могут быть очень информативными, однако они сильно различаются по размеру, что затрудняет амплификацию с помощью ПЦР (см. рисунок) [33].

Использование видоспецифичной ПЦР позволяет быстро обнаруживать патогены и провести их количественную оценку, «пангрибковые» методы могут обнаруживать широкий спектр видов грибов, но данные методы трудоемки (результаты обычно доступны в течение 2–3 дней) и требуют пост-ПЦР-анализа, обычно секвенирования и анализа последовательностей *in silico* для точной идентификации. К тому же использование «пангрибковых» методов ограничено ложноположительными результатами из-за загрязнения ДНК грибов (в окружающей среде или в лаборатории). Загрязнение образца может происходить во время его сбора или во время обработки образца на этапе предварительного секвенирования [34].

Секвенирование

Идентификация грибов на основе секвенирования ДНК – это еще один метод молекулярной идентификации грибковых патогенов. Данный диагностический подход широко используется в настоящее время благодаря большому количеству необходимой общедоступной информации о последовательностях рДНК грибов, содержащейся в ряде баз данных, таких как GenBank, UNITE и Bold. Полученная в результате проведения молекулярно-генетических исследований информация обрабатывается с применением штрихкодирования и меташтрихкодирования.

Молекулярные данные ITS-региона последовательности ДНК грибов являются основным генетическим маркером; более 1 000 000 полноразмерных последовательностей ДНК ITS-регионов грибов, полученных по Сэнгеру, доступны для справки в базах данных последовательностей ДНК [35].

Хотя секвенирование представляет собой точный метод идентификации ИГИ, всегда существует вероятность получения ложных результатов вследствие непреднамеренных ошибок на преаналитических и аналитических этапах. В частности, загрязнение исследуемого образца биоматериала комменсальными грибами на стадии отбора может привести к получению ложноположительного результата. Следует избегать тестирования образцов из нестерильных источников, а результаты секвенирования грибковой ПЦР всегда должны коррелировать с клиническими и гистопатологическими данными. При выявлении необычных или менее распространенных патогенов ИГИ следует повторить весь анализ с новой ДНК, чтобы обеспечить воспроизводимость результатов. Точность идентификации патогена с помощью секвенирования также зависит от наличия доступа к базе данных последовательностей, которая содержит точные и полные образцы таксономии грибов. Общедоступные базы данных могут содержать ошибочные записи или неполную выборку таксонов грибов, вызывающих заболевания, что приводит к неправильной идентификации редких грибов. Наконец, такие области, как, например, ITS2 и D2, не позволяют идентифицировать все грибы на уровне видов. Таким образом, для точной идентификации определенных грибов необходим анализ последовательности альтернативных генов [36].

Быстро развивающейся альтернативой секвенированию рДНК является полногеномное секвенирование (WGS). Ценность WGS не ограничивается простой идентификацией. WGS может предоставить эпидемиологическую информацию о каждом штамме и потенциальной лекарственной устойчивости [37–39]. На сегодняшний день данная технология продолжает оставаться финансово затратной, требует длительного времени для своего проведения и не является целесообразной для рутинного использования в большинстве клинических микробиологических лабораторий.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этиология и эпидемиология инвазивных грибковых инфекций у лиц, особенно с ослабленным иммунитетом, изменились за последние несколько десятилетий. Преимущественно это связано с более широким и не всегда рациональным применением антибиотиков при лечении бактериальных инфекций, а также профилактическим использованием антимикотических препаратов для предотвращения инвазивных микозов. При этом основные факторы риска грибковых инфекций в основном остались неизменными и включают в себя длительную нейтропению, иммуносупрессию, онкогематологическую патологию, трансплантацию органов и тканей, проведение хирургических манипуляций (включая оперативные вмешательства и катетеризацию сосудов и полостей).

Ранняя диагностика и адекватная терапия достоверно улучшают показатели выживаемости пациентов с инвазивными грибковыми инфекциями. Улучшения в диагностике и терапии грибковых инфекций требуют как более быстрых, чувствительных и специфичных подходов в диагностике, так и повышенного внимания к применению противогрибковой терапии. Профилактическое и лечебное применение антимикотиков в определенной мере сопряжено с риском развития резистентности грибковой микрофлоры, повышением уровня токсичности и неблагоприятными лекарственными взаимодействиями, увеличением соответствующих финансовых затрат.

С учетом тенденции к постоянному росту числа грибковых инфекций, совершенствование и внедрение комплексного диагностического подхода на ранних стадиях развития заболевания является одним из путей уменьшения последствий заболеваемости и снижения смертности при инвазивных микозах.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pathakumaria B., Lianga G., Liua W. Immune defense to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;130(165):110550. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110550>
2. Lass-Flörl C., Samardzic E., Knoll M. Serology anno 2021 – fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(9). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.005>
3. Sanguinetti M., Posteraro B., Beigelman-Aubry C. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(2):27–37. doi: 10.1093/jac/dkz041
4. Jenks J.D., Cornely A.O. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses*. 2020;63(10):1021–1032. doi: 10.1111/myc.13148
5. Palash S., Singh N. Complications of invasive mycoses in organ transplant recipients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2016;14(12). doi: 10.1080/14787210.2016.1242412
6. Terrero-Salcedo D., Powers-Fletcher M.V. Updates in Laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):e01487–19. doi: 10.1128/JCM.01487-19
7. Hsu L.Y., Lee D.G., Yeh S.P. Epidemiology of invasive fungal diseases among patients with haematological disorders in the Asia-Pacific: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):594.e7–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.019>
8. Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(4):171–178. doi: 10.1016/j.riam.2018.07.002
9. Gonzalez-Lara M.F., Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):3–12. doi: 10.1055/s-0040-1701215
10. Schmiedel Y., Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14281. doi: 10.4414/SMW.2016.14281
11. Brown G.D., Denning D.W. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165rv13.
12. Enoch A.D., Yang H., Aliyu S.H. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods in molecular biology*. 2017;1508:17–65. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1_2
13. Jeong W., Keighley C., Wolfe R. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):26–34. doi: 10.1016/j.cmi.2018.07.011
14. Gryganskyi A.P., Golan J., Dolatabadi S. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(6):2007–2018. doi: 10.1534/g3.118.200235
15. Li E., Rodriguez A., Luong A.U. The immune response to airway mycosis. *Curr Opin Microbiol*. 2021;62:45–50. doi: 10.1016/j.mib.2021.04.009
16. Seth R., Xess I., Jana M. Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Children. *Indian Pediatr*. 2019;56(3):229–236.
17. Otašević S., Momčilović S., Stojanović N.M. Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens. *J Mycol Med*. 2018;28(2):236–248. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.03.001
18. Prattes J., Flick H., Prüller F. Novel Tests for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014;190(8):922–929.
19. Zhu A., Zembower T., Qi C. Molecular detection, not extended culture incubation, contributes to diagnosis of fungal infection. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1159. doi: 10.1186/s12879-021-06838-6
20. Shabaana A.E., Elbazb L.M., El-Emshatyc W.M. Role of serum 1,3 β -D-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2018;94(5):559–565. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.07.020
21. Ruhnke M., Behre G., Buchheidt D. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). *Mycoses*. 2018;61(11):796–813. doi: 10.1111/myc.12838
22. Vehreschild J.J., Koehler P., Lamoth F. Future challenges and chances in the diagnosis and management of invasive mould infections in cancer patients. *Med Mycol*. 2021;59(1):93–101. doi: 10.1093/mmy/myaa079
23. Chong G.M., Maertens J.A. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):428–31. doi: 10.1128/JCM.02913-15
24. Mercier T., Castagnola E., Marr K.A. Defining Galactomannan Positivity in the Updated EORTC/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Fungal Diseases. *Clin Infect Dis*. 2021;72(2):89–94. doi: 10.1093/cid/ciaa1786
25. Melancon C.C., Lindsey J., Russell G.B. The role of galactomannan Aspergillus antigen in diagnosing acute invasive fungal sinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(1):60–66. doi: 10.1002/alr.22225
26. Duettmann W., Koidl C., Krause R. Specificity of mannan antigen and anti-mannan antibody screening in patients with haematological malignancies at risk for fungal infection. *Mycoses*. 2016;59(6):374–8. doi: 10.1111/myc.12482
27. Kumar J., Singh A., Seth R. Prevalence and predictors of invasive fungal infections in children with persistent febrile neutropenia treated for acute leukemia – A prospective study. *Indian J Pediatr*. 2018;85(12):1090–1095. doi: 10.1007/s12098-018-2722-0
28. Warris A., Lehrnbeher T. Progress in the Diagnosis of Invasive Fungal disease in Children. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;11(2):35–44. doi: 10.1007/s12281-017-0274-9
29. Wang K., Luo Y., Zhang W. Diagnostic value of Candida mannan antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for Candida infection. *Mycoses*. 2020;63(2):181–188. doi: 10.1111/myc.13035
30. Rath P.M., Steinmann J. Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of Aspergillus spp. DNA in Patient Samples. *Front Microbiol*. 2018;9:740. doi: 10.3389/fmicb.2018.00740
31. Douglas A.P., Chen S.C., Slavin M.A. Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):670–80. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.011

32. Camp I., Manhart G., Schabereiter-Gurtner C. Clinical evaluation of an in-house panfungal real-time PCR assay for the detection of fungal pathogens. *Infection*. 2020;48(3):345–355. doi: 10.1007/s15010-020-01395-7
33. Meason-Smith C., Edwards E.E., Older C.E. Panfungal Polymerase Chain Reaction for Identification of Fungal Pathogens in Formalin-Fixed Animal Tissues. *Vet Pathol*. 2017;54(4):640–648. doi: 10.1177/0300985817698207
34. Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019;64(3):421–428. doi: 10.1007/s12223-018-00669-w
35. Nilsson R.H., Larsson K.-H., Taylor F.S. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D259–D264. doi: 10.1093/nar/gky1022
36. Gomez C.A., Budvytiene I., Zemek A.J. Performance of Targeted Fungal Sequencing for Culture-Independent Diagnosis of Invasive Fungal Disease. *Clin Infect Dis*. 2017;65(12):2035–2041. doi: 10.1093/cid/cix728
37. Mohanta T.K., Bae H. The diversity of fungal genome. *Biol Proced Online*. 2015;17:8. doi: 10.1186/s12575-015-0020-z
38. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 2012;125(1):14–24. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.10.008
39. Kim S.H., Choi J.K., Cho S.Y. Risk factors and clinical outcomes of breakthrough yeast bloodstream infections in patients with hematological malignancies in the era of newer antifungal agents. *Medical Mycology*. 2018;56:197–206. doi: 10.1093/mmy/myx038

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.012>



Камышников В.С.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Институт резидентуры по лабораторной медицине: опыт его формирования, организация клиничко- лабораторной деятельности и система подготовки врачей-специалистов (медицинских патологов) за рубежом

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 01.08.2022
Принята: 05.09.2022
Контакты: kam-prof@mail.ru

Резюме

В статье представлена информация об отличительных особенностях систем подготовки и содержания программ до- и последипломного обучения специалистов лабораторной медицины с разным базовым профильным образованием в странах дальнего и ближнего зарубежья. Уделено внимание системе последипломной подготовки врачей клиничко-лабораторной службы в Белорусской медицинской академии последипломного образования. Отмечено, что кафедра клинической лабораторной диагностики БелМАПО располагает более чем полувековым опытом последипломной подготовки специалистов в клинической ординатуре, открытой при кафедре БелГИУВ (БелМАПО) со времени ее создания в 1970 г. Еще в советский период времени врачи-лаборанты проходили обучение не только в обычной клинической ординатуре (с продолжительностью обучения в два года), но также в специальной клинической ординатуре («спецординатуре») в течение трех лет, из которых первый год обучения был посвящен освоению иностранных языков. Врачами, закончившими специальную ординатуру, реализовывался экспорт образовательных услуг – приобретенных на кафедре знаний и умений – в страны Африки и Латинской Америки, чему способствовало использование в длительных зарубежных командировках ряда руководств, подготовленных преподавателями кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО.

Ключевые слова: резидентура, клиническая лабораторная диагностика, лабораторная медицина, медицинская (анатомическая, клиническая) патология, последипломная подготовка, клинические патологи

Kamyshnikov V.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Institute of Residency in Laboratory Medicine: The Experience of Its Formation, the Organization of Clinical and Laboratory Activities and the System of Training Medical Specialists (Medical Pathologists) Abroad

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 01.08.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: kam-prof@mail.ru

Abstract

The article provides information on the distinctive features of the training systems and content of pre- and postgraduate training programs for laboratory medicine specialists with different basic specialized education in the countries of the near and far abroad. Attention is paid to the system of postgraduate training of doctors of clinical and laboratory service at the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education. It is noted that the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education has more than half a century of experience in postgraduate training of specialists in clinical residency, opened at the Department of the Belarusian State Institute for Postgraduate Medical Education since its establishment in 1970. Back in the Soviet period, laboratory doctors were trained not only in ordinary clinical residency (with a duration of training of two years), but also in special clinical residency ("special residency") for three years, of which the first year of training was devoted to the development of foreign languages. Doctors who completed special residency implemented the export of educational services – acquired at the department of knowledge and skills – to the countries of Africa and Latin America, which was facilitated by the use of a number of manuals prepared by teachers of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics on long-term foreign business trips.

Keywords: residency, clinical laboratory diagnostics, laboratory medicine, medical (anatomical, clinical) pathology, postgraduate training, clinical pathologists

■ ВВЕДЕНИЕ

18 июля 2022 г. состоялось совещание Президента Республики Беларусь с представителями руководства Министерства здравоохранения Республики Беларусь и ректорами медицинских университетов страны по поводу издания Указа Президента о белорусской медицинской резидентуре. Оно было посвящено дальнейшему совершенствованию последиplomной подготовки врачей. В ходе обсуждения было отмечено широкое использование высокотехнологичных методов исследования

и совершенной автоматизированной аппаратуры для повышения эффективности оказания лечебно-диагностической помощи населению.

Обращено внимание на то, что за прошедшие годы в стране накоплен положительный опыт подготовки специалистов через институты интернатуры и клинической ординатуры, который необходимо использовать в будущем. Главой государства было отмечено, что не следует слепо копировать иностранные стандарты. Речь может идти лишь о совершенствовании системы подготовки специалистов. Необходимо подготовить такую систему, после прохождения которой молодым специалистам уже не потребуются посторонняя помощь в освоении современных высокотехнологичных методов диагностики, профилактики и лечения.

По мнению представителей руководства Министерства здравоохранения Республики Беларусь, в основе модификации обсуждаемой системы последиplomной подготовки должна лежать ее выраженная практико-ориентированная направленность.

■ ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Клиническая лабораторная диагностика (в Беларуси, России), или (что то же) лабораторная медицина (в России, Германии, Беларуси), клиническая (медицинская) патология (в США), клиническая/медицинская биология (во Франции, Бельгии, Нидерландах, Австрии и некоторых других странах), биопатология (в Греции), – специальность, тесно связанная с выполнением лабораторных исследований состава и свойств проб биологического материала с последующей трактовкой полученных результатов.

Вместе с тем клиническая лабораторная диагностика – не только вид профессиональной деятельности по оказанию специализированной лечебно-диагностической помощи населению, но и научная специальность, имеющая свой шифр – 14.03.10 – в перечне научных специальностей ВАК Беларуси и России. Она являет собой пример междисциплинарной науки, возникшей на стыке клинической медицины с биологией, химией, физикой, генетикой и другими фундаментальными науками и объединяющей в себе достижения медицины и естествознания.

Клиническая лабораторная диагностика (лабораторная медицина) как отрасль медицинских знаний в настоящее время лежит в основе всех видов клинической деятельности, она поставляет практическому здравоохранению более 80% объективной информации, имеющей существенное значение для постановки клинического диагноза заболевания, оценки особенностей течения и прогноза развития патологического процесса.

Клиническая лабораторная диагностика как самостоятельная научно-практическая дисциплина составляет фундаментальную базу не только доказательной, но также трансляционной, предиктивной и персонализированной медицины. Если доказательная лабораторная медицина основывается на использовании в клинической практике уже хорошо известных объективных, научно обоснованных критериев лабораторной диагностики, то предиктивная, персонализированная медицина – на постановке лабораторных тестов оценки прогноза (предвидения) формирования заболевания у конкретного человека на основе исследования индивидуальных особенностей его генома, протеома и особенностей метаболизма. Перенос же созданных

в ходе выполнения фундаментальных исследований новых технологий в медицинскую практику осуществляется в рамках «трансляционной медицины», получившей особенно благоприятное развитие в республиканских научно-практических центрах (РНПЦ) страны.

Клиническая лабораторная диагностика (лабораторная медицина) базируется на трех основных тесно связанных между собой составляющих, каковыми являются:

- 1) клиническая патобиология – теоретический базис, позволяющий осмыслить патогенетическую значимость обнаруживаемых в организме метаболических изменений;
- 2) клиническая аналитика – высокотехнологичный методический арсенал, обеспечивающий доступ к изучению различных компонентов биологического материала;
- 3) клиничко-лабораторная информатика – концептуальный аппарат оценки диагностической значимости обнаруживаемых метаболических изменений.

Основными субдисциплинами специальности «клиническая лабораторная диагностика», получившими наиболее широкое распространение в нашей стране и в Российской Федерации, являются:

- 1) общеклинические исследования (химико-микроскопический анализ);
- 2) лабораторная гематология;
- 3) клиническая биохимия, включающая в себя клиническую коагулологию, энзимологию, витаминологию, гормонологию и другие ее подразделы;
- 4) клиническая цитология – исследование клеток в соскобах, смывах, в различных биологических жидкостях (кроме крови);
- 5) клиническая иммунология – исследование иммунных факторов: клеточных и тканевых антигенов, антител, системы комплемента, цитокинов, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов (аутоиммунных поражений, состояний иммунодефицита);
- 6) клиническая микробиология – исследование микроорганизмов в биологических жидкостях человека в связи с их патогенной ролью. Включает в себя:
 - клиническую бактериологию;
 - клиническую вирусологию;
 - клиническую микологию (исследование грибов);
- 7) клиническая паразитология – исследование паразитарных организмов (простейших, червей и др.) и их участия в развитии заболеваний;
- 8) ряд других.

Освоение данного предмета предполагает приобретение врачами знаний и умений в трех тесно связанных между собой областях:

- современных представлений о метаболизме заболеваний;
- методологии и технологии аналитических исследований;
- интерпретации полученных при этом результатов.

На эти основные аспекты исследований и нацелена деятельность специалистов клинической лабораторной диагностики.

В странах дальнего и ближнего зарубежья лабораторные работники высшего звена представлены в основном специалистами с медицинским, биологическим или фармакологическим образованием, а специалисты среднего звена – медицинскими лабораторными техниками, медицинскими технологами, флеботомистами, лабораторными ассистентами и регистраторами. В штате ряда крупных клиничко-диагностических лабораторий состоят инженеры, программисты, администраторы, финансовые

менеджеры. Но, как правило, медицинским консультированием (и часто – руководством деятельностью лабораторий) занимаются специалисты в области лабораторных исследований, имеющие высшее медицинское образование [1–3].

В клинических лабораториях за рубежом специалисты в области лабораторных исследований известны как медицинские патологи. Под «медицинской патологией» понимают диагностику, она подразделяется на анатомическую, клиническую и, в ряде случаев, научно-исследовательскую патологию: каждая из них включает в себя ряд других, более узких, дисциплин. У клинической и анатомической патологии единая цель – понимание этиологии и патогенеза заболеваний, а также причин смерти, что очень важно для совершенствования лечебно-профилактического процесса на основании использования результатов выполненного лабораторного исследования.

К медицинским патологам относятся специалисты, деятельность которых направлена на оценку состояния здоровья пациента, установление причины заболевания, осуществление диагностики и мониторинга лечения по результатам выполнения лабораторных исследований. Они отвечают за получение и интерпретацию всей клинико-лабораторной информации и консультируют лечащих врачей по всем входящим в их компетенцию вопросам.

«Анатомическая патология» (в России и Беларуси – «патологическая анатомия») – медицинская специальность, связанная с выполнением наряду с макроскопическим анализом микроскопических, субклеточных и молекулярных исследований различных компонентов тканей жизненно важных органов. Она также базируется на использовании лабораторных методов исследования: общеморфологических, иммуногистохимических, электронно-микроскопических, иммунофлюоресцентных, флюоресцентно-гибридизационных и др. Для того чтобы стать лицензированным специалистом в этой области медицины, выпускник медицинского факультета должен получить степень доктора медицины, пройти резидентуру по анатомической патологии и сдать сертификационный экзамен [4].

«Клиническая патология» (в США) также является медицинской диагностической дисциплиной, связанной с лабораторным исследованием состава и свойств биологических жидкостей. К числу ее субдисциплин относятся клиническая химия, лабораторная гематология (гемопатология), трансфузиология и коагулология, микробиология, иммунопатология, молекулярная патология, цитогенетика. В ней используются химические (энзиматические, хроматографические, масс-спектрометрические), культуральные, иммунологические, серологические, молекулярно-биологические, гематологические методы анализа, проточная цитометрия и другие лабораторные технологии лабораторного исследования.

Клинические патологи выступают в роли консультантов других врачей, используя свои знания для оказания помощи в диагностике заболеваний и лечении пациентов [5].

Деятельность специалистов лабораторной медицины в области научных исследований (pathology research) связана с углубленным изучением отдельных клинических случаев и созданием экспериментальных моделей заболеваний: они работают с клеточными культурами и тканевыми препаратами.

Реализация выполнения клинико-лабораторных исследований сотрудниками клинико-диагностических лабораторий высшего звена возможна при условии получения ими необходимого образования.

В США получение высшего медицинского образования достигается 4-летней подготовкой по общенаучным дисциплинам (биология, химия, анатомия) и 4-летним изучением медицинских дисциплин в сочетании с практикой. Для прохождения специализации, необходимой для занятия должности медицинского патолога, требуется дополнительное 4- или 3-годичное обучение в рамках резидентуры в аккредитованном медицинском образовательном учреждении – колледже, университетской клинике, госпитале, а также наличие степени доктора медицины (MD). При приеме на работу большое значение имеет выдаваемый American Board of Pathology сертификат по соответствующему виду патологии.

В резидентуре США подготовка клинических патологов осуществляется согласно программе Curriculum Content and Evaluation of Resident Competency in Clinical Pathology (Laboratory Medicine) в течение 3–4 лет после получения медицинского образования. План подготовки клинических патологов включает в себя основные разделы лабораторной медицины, а каждый раздел – уровни умений (I, II, III). Уровень I соответствует тем видам знаний и умений (действий), которыми овладевают резиденты на первом и/или втором году обучения по двум специальностям «патологическая анатомия» / «клиническая патология» или только на первом году обучения по специальности «клиническая патология». Уровень II приобретает резидентом на третьем и/или четвертом году обучения по специальностям «патологическая анатомия» / «клиническая патология» или на втором году обучения по специальности «клиническая патология». Этот уровень знаменуется приобретением резидентом общих навыков во всех областях лабораторной медицины, в связи с чем он получает свидетельство клинического патолога. Уровень III (третий год обучения в резидентуре по специальности «клиническая патология» и третий-четвертый год обучения по специальностям «патологическая анатомия» и «клиническая патология») – это высший уровень компетентности специалиста. На этом уровне резидент допускается к педагогической работе с «младшими» резидентами [4, 5].

По окончании резидентуры медицинские патологи могут работать в госпиталях, государственных и правительственных агентствах, в частных лабораториях. Многие ведут преподавательскую деятельность – с учетом того, что данная дисциплина является одной из базовых в медицинском образовании.

В Японии для подготовки клинических патологов с 2001 г. стала обязательной двухгодичная «общеклиническая» подготовка, в ходе которой осваиваются как навыки клинического исследования, так и базовые лабораторные процедуры. Далее при прохождении трехгодичной резидентуры подробно разбираются принципы исследований, конкретные лабораторные тесты, материально-техническое (аппаратное, инструментальное) обеспечение лабораторий, информативность лабораторных исследований в областях клинической химии, гематологии, микробиологии, иммунологии, трансфузиологии и других; в дополнение к этому отрабатываются принципы лабораторного менеджмента – взаимодействия с лабораторным персоналом, лечащими врачами и пациентами. В последующем рекомендуется сертификация специалистов в Совете JSLM Japanese Society of Laboratory Medicine.

В странах Евросоюза требования к базовому образованию лабораторных специалистов различаются: оно может быть медицинским, биологическим, химическим или фармацевтическим. Соответствующие должности обозначаются как «медицинский/клинический патолог» (во всех странах), «исследователь» (Research Lab Scientist,

во всех странах), «биопатолог» (Греция), «фармацевт-биолог» (Франция), «клинический исследователь» (Clinical Scientist, Великобритания) и др.

Обучение специалистов лабораторной службы в европейских странах проводится в соответствии с Европейским соглашением (European Syllabus For-Graduate Training in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), в котором кратко описана специальность, обозначены ее цели и задачи, приведены сведения о необходимых для приобретения обучающимися знаниях и умениях, касающихся различных разделов и субдисциплин клинической химии и лабораторной медицины.

В Великобритании общая продолжительность подготовки клинических патологов составляет 11–12 лет, из них 5 лет приходится на обычные и медицинские дисциплины, 1–2 года – на общемедицинскую подготовку, 5 лет – на резидентуру по патологии. По окончании обучения сдается экзамен с привлечением в качестве сертифицирующего органа Royal College of Pathologists. С учетом типа и продолжительности подготовки возможно получение отдельных дипломов по цитопатологии, нейропатологии, дерматопатологии и патологии в педиатрии.

В Германии подготовка клинического патолога занимает минимум 10 лет, из которых первые 5 лет приходятся на базовое медицинское образование, следующие 5 лет – на последипломное обучение, а именно на резидентуру и стажировку по субдисциплинам медицинской патологии. Кроме клинических патологов, в лабораториях Германии работают исследователи (scientists) – биологи, биохимики, химики, которые занимаются как выполнением рутинных исследований, так и научными работами на клиническом и экспериментальном материале. Для получения ученой степени PhD предусмотрена отдельная 3-годичная научная стажировка.

Клинико-диагностические лаборатории и их отделы в университетских клиниках страны, как правило, возглавляются медицинскими (клиническими) патологами, но в виде исключения эти должности могут занимать исследователи, имеющие большой опыт работы и ученую степень. Деятельность специалистов лабораторной медицины осуществляется в рамках и под эгидой национальной профессиональной организации работников лабораторий в Германии – Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC).

Во Франции подготовка врачей (клинических патологов) занимает 10–12 лет. Первый и второй годы обучения посвящаются фундаментальным дисциплинам; на протяжении последующих 4 лет идет освоение общих и специальных медицинских дисциплин, при этом обучение сочетается с ежедневной практикой в госпиталях. Последующая последипломная подготовка по специальности в резидентуре и интернатуре осуществляется в университетском клиническом госпитале в течение 4 лет; за это время сдаются экзамены по клинической биохимии, лабораторной гематологии, иммунологии, паразитологии, бактериологии и вирусологии. В резидентуре готовят врачей общего профиля, а в интернатуре со сроками обучения 4–5 лет – специалистов по узким направлениям лабораторной медицины.

Основная часть специалистов клинических лабораторий во Франции имеют университетское фармацевтическое образование: фармацевты-биологи составляют 75% от общей численности специалистов высшего звена, а 25% из них приходится на медицинских биологов и клинических патологов. Медицинские биологи могут пройти дополнительный двухгодичный курс обучения по отдельным формам и субдисциплинам патологии. Государственная регистрация и перерегистрация специалистов

лабораторий производится ежегодно и зависит от активности их профессиональной деятельности. Производственная деятельность в медицинских лабораториях курируется национальной профессиональной организацией – Société Française de Biologie Clinique (SFBC).

В Боснии и Герцеговине специализация по лабораторной медицине длится 3 года и проводится в университетских клиниках по различным программам в соответствии с базовым образованием обучающихся [6].

В Хорватии обучение специалистов по лабораторной медицине занимает 4 года. Оно предусматривает прохождение обязательной профессиональной подготовки в специальных клиниках, а также пребывание в аспирантуре. Программа профессиональной подготовки включает освоение: медицинской биохимии (15 месяцев), гематологии и коагулологии (11 месяцев), иммунологии (5 месяцев), микробиологии (2 месяца) и медико-санитарной помощи (11 месяцев).

В Литве возможность пройти обучение по лабораторной медицине имеет только практикующий врач с высшим медицинским 6-летним образованием. В соответствии с Директивой Совета 93/16/ЕЕС от 5 апреля 1993 г. в целях содействия свободному движению врачей и взаимному признанию дипломов, сертификатов и других официальных свидетельств квалификации был введен 4-летний курс обучения в ординатуре по лабораторной медицине [7].

В странах СНГ вид подготовки специалистов клинической лабораторной диагностики и клинической биохимии «резидентура» также начал использоваться в образовательном последипломном процессе. Так, приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 30 января 2008 г. № 28 было утверждено Положение о резидентуре, в соответствии с которым намечено обучение в резидентуре при Казахском национальном медицинском университете с 2014 г.

В Азербайджане постановлением Кабинета министров страны № 50 утверждены «Содержание и правила организации образовательной резидентуры». Правила разработаны в соответствии с Законом Азербайджанской Республики «Об образовании» и охватывают все медицинские вузы и научные учреждения. Учебный план и программа утверждаются Министерством здравоохранения. Обучение в резидентуре осуществляется на базе учебных и научных учреждений и ведущих клиник. Потребность в слушателях-резидентах определяется Кабинетом министров, а ее прохождение засчитывается в рабочий стаж. Окончившим резидентуру присваивается степень врача-специалиста по специальности.

Характерно, что последипломное образование специалистов высшего звена лабораторной медицины во всех странах мира носит непрерывный характер и включает участие в семинарах и научных симпозиумах, прохождение учебных курсов продолжительностью от полудня до 5–6 дней, участие в аудио- и телеконференциях, «электронных» курсах с разбором клинических случаев, лабораторных препаратов и т. д. Все образовательные мероприятия, претендующие на статус составной части последипломного обучения, предварительно аккредитуются в национальных и профессиональных организациях, и им присваивается определенный «вес» в кредитных единицах (он приблизительно соответствует продолжительности лекций, семинаров в часах). Часто краткосрочные курсы и семинары проводятся непосредственно в госпиталях и клиниках; их организуют специальные менеджеры по обучению персонала. В результате специалист должен набрать определенное количество

образовательных единиц – обычно не менее 50 в год, или 250 за 5 лет, что является обязательным условием продления сертификата (перерегистрации). За соблюдением этого требования следят как федеральные контрольно-регистрационные организации, так и менеджеры госпиталей.

Следует отметить, что кроме патологов, биологов и исследователей в лабораториях работает значительное количество специалистов среднего звена (медицинских лабораторных техников и технологов), которые составляют основную часть кадров лабораторной службы. По мере внедрения автоматизированных компьютерных технологий среднему персоналу приходится в основном выполнять автоматизированные тесты. «Ручные» исследования средним персоналом проводятся редко, так как сложность проводимых тестов, ответственность за их результаты напрямую зависят от уровня образования и практического опыта специалиста.

Клинические (медицинские) лабораторные технологи (Medical Technologists, Clinical Laboratory Scientists) выполняют достаточно сложные химические, биологические, гематологические, иммунологические и бактериологические исследования. Они микроскопируют препараты крови, других биологических жидкостей, проводят культуральные исследования по поиску и идентификации бактерий, грибов, паразитов и других микроорганизмов, выполняют изосерологические тесты. В задачи технологов входят также оценка результатов тестов, совершенствование аналитических процедур, освоение и мониторинг программ обеспечения надежности выполнения лабораторных исследований.

В небольших лабораториях технологи выполняют широкий спектр тестов, а в крупных клиничко-диагностических лабораториях обычно специализируются на осуществлении специальных их видов: биохимических, гормональных, трансфузиологических, иммуногематологических, микробиологических, иммунологических, молекулярно-биологических или цитологических (цитотехнологи).

Клинические (медицинские) лабораторные техники занимаются выполнением менее сложных тестов и лабораторных процедур; они готовят препараты, работают на автоматических анализаторах, выполняют «ручные» тесты в соответствии с инструкциями (обычно под наблюдением медицинских технологов). Как и технологи, техники могут работать в разных областях лабораторной медицины, специализируясь на выполнении определенных лабораторных процедур. Например, гистохимики готовят и окрашивают препараты для последующего их анализа патологами. Находящиеся в штате лаборатории флеботомисты берут пробы крови у пациентов.

Лабораторные техники, как правило, должны иметь сертификаты, выданные клиническим госпиталем, медицинским колледжем (Medical School) или военно-медицинским учреждением.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резидентура как высшая ступень практико-ориентированной фундаментальной последипломной подготовки врачей-специалистов призвана обеспечить подготовку «идеальных» специалистов, владеющих необходимыми теоретическими знаниями и практическими навыками для осуществления самостоятельной работы на современном уровне.

В связи с широким внедрением новейших лабораторных технологий и лабораторного оборудования в лечебно-профилактические организации, открытием «мощных» диагностических центров возникает все большая потребность в таких

специалистах, которые могли бы не только самостоятельно осуществлять разные виды высокотехнологичных лабораторных исследований, но также консультировать лечащего врача по результатам их выполнения для определения и уточнения диагноза в каждом конкретном случае. К тому же врач клинической лабораторной диагностики должен владеть методологией научно-исследовательской работы с целью разработки и внедрения в практику современных достижений медико-биологических наук, биохимии и молекулярной биологии.

К этим и многим другим аспектам деятельности во многом сводилась направленность обучения врачей (клинической) лабораторной диагностики в клинической ординатуре по клинической лабораторной диагностике, открытой при кафедре клинической лабораторной диагностики БелГИУВ со времени ее создания в 1970 г.

Программой обучения в клинической ординатуре предусмотрено освоение новой научно-медицинской информации по следующим темам: организация рабочего места для проведения лабораторных исследований, осуществляемых с применением морфологических (цитологических), гематологических, биохимических, общеклинических, иммунологических, медико-биологических, генетических, цитогенетических, паразитологических и других методов исследований; постановка лабораторного диагноза на основе выделения характерных показателей, отражающих изменения метаболизма при конкретном заболевании; организация проведения внутрилабораторного и межлабораторного контроля качества лабораторных исследований.

В советский период времени врачи-лаборанты проходили обучение и в специальной клинической ординатуре (с продолжительностью обучения 3 года), отличавшейся от 2-годичной традиционной освоением иностранного языка на первом году обучения.

Закончившими спецординатуру реализовывался экспорт приобретенных за время обучения в клинической ординатуре знаний и умений (образовательных услуг) в страны Африки и Латинской Америки, в ряде случаев с использованием подготовленных преподавателями кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ руководств по клинической лабораторной диагностике, в том числе таких как «Клиническая биохимия» (В.Г. Колб, В.С. Камышников, Мн.: Беларусь, 1976, 311 с.) и «Справочник по клинической химии», 2-е изд., перераб. и доп. (В.Г. Колб, В.С. Камышников, Мн.: Беларусь, 1982, 366 с., илл.).

Накопленный кафедрой опыт обучения врачей клинической лабораторной диагностики в институте клинической ординатуры может быть использован для организации (в случае необходимости) системы обучения специалистов лабораторной медицины в резидентуре.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gil'man Z.Zh. *Who works in clinical laboratories abroad?* Interlabdiagnostika – 2009, p. 4. (in Russian)
2. Kamyshnikov V.S. Laboratory medicine abroad: training and clinicolaboratory activity of professionals with medical and non-medical education. *Medicinskie novosti*. 2011;3:55–64. (in Russian)
3. Kamyshnikov V.S. *Formation of laboratory medicine in the Republic of Belarus*. Minsk, BelMAPO, 2021. (in Russian)
4. Luneva A.G., Pogorelaya L.I., Olejnik E.A. Experience of establishing the institution of residency in the U.S. and Europe. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2013;3(7):6–9. (in Russian)
5. Smith B.R., Wells A., Alexander C.B. Curriculum Content and Evaluation of Resident Competency in Clinical Pathology (Laboratory Medicine): A Proposal. *Clinical Chemistry*. 2006;52(6):917–949.
6. Winterhalter-Jadric M., Causevic A., Jadric R., Coric J., Hasic S., Kiseljakovic E. Education of medical biochemists in Bosnia and Herzegovina. *Biochemia Medica*. 2011;21(1):12–14.
7. Ausrele Kucinskiene Z., Bartlingas J. Laboratory medicine education in Lithuania. *Biochemia Medica*. 2011;21(1):43–48.

Рецепт успеха в профессии врача –
на **recipe.by**



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ



**ПРЕДЛАГАЕМ НОВУЮ МОДЕЛЬ
НАУЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ –
ОТКРЫТЫЙ ДОСТУП КО ВСЕМ НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ,
ОПУБЛИКОВАННЫМ В ЖУРНАЛАХ ИЗДАТЕЛЬСТВА.**

**Бесплатный доступ ко всем 15 журналам
через сайт позволит:**

- читателям – получить доступ к актуальной научной информации,
- авторам – повысить индекс цитируемости своих материалов и получить признание в международном сообществе.

**Учитывая расширившиеся возможности издательства и нашу уверенность
в успешной деятельности, приглашаем вас к сотрудничеству!**