

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

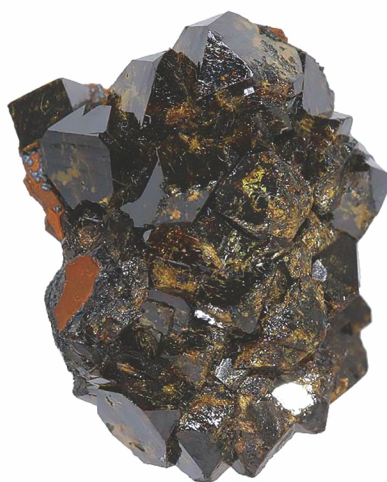
2024, том 13, № 2

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics Eastern Europe

International Scientific Journal

2024 Volume 13 Number 2



Бёдантит – вторичный минерал зоны окисления месторождений полиметаллов, образующийся при изменении свинцовых руд, особенно сульфоселей. Впервые был обнаружен в 1826 г. в Германии, а назван в честь французского геолога и минералога Франсуа Бёдана.

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



9 772226 539008



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная Европа

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2024, том 13, № 2

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован

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

Учредитель

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

Редакция:

Директор Л.А. Евтушенко

Заместитель главного редактора А.В. Жабинский

Руководитель службы рекламы и маркетинга М.А. Коваль

Технический редактор Д.В. Нужин

Адрес:

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

Россия

Журнал зарегистрирован

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

Учредитель и издатель

ООО «Вилин – Профессиональные издания»

Редакция:

Директор Н.А. Рабкова

Адрес:

214522, Смоленская обл., Смоленский р-н, с.п. Катынское,
п. Авторемзавод, д. 1А, пом. 413
Тел.: +7 4812 515923
e-mail: lab@recipe.by

Подписка

В каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):
индивидуальный индекс – 01389, ведомственный индекс – 013892

В электронных каталогах на сайтах агентств:
ООО «Прессинформ», ООО «Кризитив Сервис Бэнд»,
ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

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

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию

Журнал выходит один раз в три месяца
Цена свободная

Подписано в печать: 07.05.2024

Дата выхода в свет: 17.05.2024

Формат 70х100¹/₁₆

Печать офсетная

Тираж 1000 экз. (Беларусь), 5000 экз. (Россия)

Заказ №

Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№2/18 от 26.11.2013. Пл. Свободы, 23-103, г. Минск.
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика Восточная Европа»

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

© УП «Профессиональные издания», 2024

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2024

© ООО «Вилин – Профессиональные издания», 2024

Главные редакторы:**Камышников Владимир Семенович,**

д.м.н., проф., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Беларусь)

Припутневич Татьяна Валерьевна,

чл.-корр. РАН, д.м.н., доц., директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (Россия)

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Алиева Е.В., д.м.н., доц., Центр подготовки медицинских микробиологов Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (Москва, Россия)

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

Батуревич Л.В., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

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

Вавилова Т.В., д.м.н., проф., Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия)

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

Владимирская Т.Э., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Гордеев А.Б., к.б.н., Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

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

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

Долгов В.В., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет

имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

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

Дубровский А.Ч., к.м.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Иванец Т.Ю., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

Ильина Е.Н., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Москва, Россия)

Кафарская Л.И., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет

имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Коломиец Н.Д., д.м.н., проф., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения

Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Кольцов И.П., к.м.н., доц., Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск, Россия)

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

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

Кречетова Л.В., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии

и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

Кузьменко А.Т., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

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

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

Манаева Н.А., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения

Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

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

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

Прохорова В.И., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Ребриков Д.В., проф. РАН, д.б.н., проф., Институт трансляционной медицины Национального медицинского

исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

Смолякова Р.М., д.б.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Степаненко И.С., д.м.н., доц., Волгоградский государственный медицинский университет (Волгоград, Россия)

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

Трофимов Д.Ю., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Институт репродуктивной генетики Национального медицинского

исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

Рецензируемое издание

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

Включено в перечни Высших аттестационных комиссий Республики Беларусь и Российской Федерации.

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

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

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

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2024 Volume 13 Number 2

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered

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

Founder

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

Editorial office:

Director L. Evtushenko

Deputy editor-in-chief A. Zhabinski

Head of advertising and marketing department M. Koval

Technical editor D. Nuzhin

Address:

220049, Knorin str., 17, Minsk
Phones: +375 17 322-16-77, 322-16-78
e-mail: lab@recipe.by

Russia

The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor)
on August 25, 2023.
Certificate ПИ No. ФЦ77-85799

Founder and Publisher

LLC "Vilin – Professional Editions"

Editorial office:

Director N. Rabkova

Address:

214522, Smolensk region, Smolensk district,
rural settlement Katynskoye, Avtoremzavod village, 1A, office 413
Phone: +7 4812 515923
e-mail: lab@recipe.by

Subscription

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

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:

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

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

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office

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

Sent for the press: 07.05.2024

Release date: 17.05.2024

Format 70×100 1/16

Litho

Circulation is 1000 copies (Belarus), 5000 copies (Russia)

Order No.

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics Eastern Europe"

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

© UE "Professional Editions", 2024

© Design and decor of UE "Professional Editions", 2024

© LLC "Vilin – Professional Editions", 2024

Editors-in-Chief:**Vladimir S. Kamyshnikov,**

Dr. of Med. Sci., Prof., Head of the Clinical Laboratory Diagnostics Department of the Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Belarus)

Tatiana V. Priputnevich,

Assoc. of the Russian Academy of Sciences, Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Head of the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Head Specialist in Medical Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation (Russia)

Editorial Board:

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Alieva E., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Center for Training of Medical Microbiologists of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Moscow, Russia)

Anisko L., Cand. of Med. Sci., City Clinical Infectious Diseases Hospital (Minsk, Belarus)

Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Beliaev S., Belarusian Society of Laboratory Medicine (Minsk, Belarus)

Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Gordeev A., Cand. of Biol. Sci., Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus)

Iliina E., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Research Institute for Systems Biology and Medicine of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Moscow, Russia)

Ivanets T., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kafarskaya L., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Kochetov A., Dr. of Med. Sci., Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, Russia)

Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Koltsov I., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Far Eastern State Medical University (Khabarovsk, Russia)

Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Vitebsk, Belarus)

Krechetova L., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Manaeva N., Cand. of Biol. Sci., Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof., Gomel State Medical University (Gomel, Belarus)

Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Rebrikov D., Prof. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Translational Medicine of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Stepanenko I., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Trofimov D., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Reproductive Genetics of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Vavilova T., Dr. of Med. Sci., Prof., Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia)

Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Peer-Reviewed Edition

Included in the databases Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, RSCI.

Included in the lists of the Higher Attestation Commissions of the Republic of Belarus and the Russian Federation.

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 "As advertisement" are advertisers.

Уважаемые читатели!

20 апреля текущего года состоялось весьма знаменательное событие для лабораторной медицины, связанное с 54-летием со дня открытия впервые созданной в системе последипломного образования врачей Республики Беларусь (1970) кафедры клинической лабораторной диагностики, активно осуществлявшей свою многогранную деятельность в советский и постсоветский периоды времени в составе Белорусского государственного института усовершенствования врачей, Белорусской медицинской академии последипломного образования и Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета.

Вкладу кафедры в становление школы специалистов клинической лабораторной диагностики и организацию деятельности национальной клинико-лабораторной службы посвящена первая статья, открывающая данный номер журнала. Ознакомление с ее содержанием, по мнению редколлегии, не может не убедить читателя в том, о чем говорится в резюмирующей части статьи: «... в итоге многогранной 54-летней деятельности кафедра проявила себя как ведущий образовательный, научно-практический, организационно-методический и консультативный центр клинической лабораторной диагностики в Республике Беларусь, заложив фундаментальные основы специальности "клиническая лабораторная диагностика" и внеся существенный вклад в ее дальнейшее развитие, подготовку нескольких поколений врачей клинической лабораторной диагностики, создание профессиональной и научной школы специалистов в области лабораторной медицины, а также в организацию деятельности национальной клинико-лабораторной службы».

Поскольку идеология белорусского государства во многом базируется на исторической памяти и уважении к традициям собственного прошлого, думается, что основные результаты работы и опыт преподавателей кафедры составят не только фундаментальную базу для продолжения ее профессиональной деятельности, но и для сохранения и приумножения заложенных традиций, потому как известно, что, «не зная прошлого, нельзя уверенно строить успешное будущее» и «настоящее и будущее произрастают из прошлого».

По-прежнему радует то, что в журнал поступают статьи от наших коллег – специалистов дружественных



стран «ближней и дальней дуги». Так, не может не обратить на себя внимание обнаружение сотрудниками Ростовского государственного университета и Научно-практического центра специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого (Россия) ассоциации носительства SARS-CoV-2 с уровнем гиперметирированной формы аргинина – нового лабораторного теста оценки дисфункции эндотелия, способной вызвать существенное нарушение микроциркуляции, а следовательно – еще более усугубить тяжесть состояния пациента.

По традиции на страницах журнала продолжается обсуждение вопросов, касающихся профилактики и последствий перенесенной коронавирусной инфекции.

Оптимизации осуществления специфической профилактики COVID-19 во многом способствует использование результатов, полученных группой специалистов из Ирака.

Опыт, полученный при исследовании широкого контингента пациентов, пострадавших от коронавирусной инфекции, показал, насколько важно использование тестов – предикторов неблагоприятного исхода заболевания. И в этом отношении привлекают внимание результаты исследования сотрудников Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета и Шумилинской центральной районной больницы.

В связи с продолжающимся расширением и углублением делового сотрудничества Беларуси со странами Африки и Ближнего Востока остается актуальной проблема учащения случаев завозной малярии. Поэтому представляется важным своевременное, на ранней стадии, выявление этого заболевания, чему и посвящена совместная статья врачей-инфекционистов и врачей клинической лабораторной диагностики Белорусского государственного медицинского университета.

Инновациям как в области специфической профилактики бактериальных инфекций, так и в создании новых технологий лечения с осуществлением лабораторного контроля его эффективности посвящены статьи наших коллег из Ирака (представлены в рубрике «Микробиология и вирусология»).

Особое внимание привлекает статья специалистов из Университета Багдада, посвященная разработке и апробации в эксперименте нового способа заживления костных ран и переломов, состоящего в местном применении трикальцийфосфата и коллагена.

Судя по статье сотрудников Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии, в этом учреждении уверенно

развиваются инновационные лабораторно-диагностические технологии, ориентированные на совершенствование диагностики и дифференциальной диагностики различных форм лейкозов.

Разработке программ и алгоритмов лабораторной диагностики заболеваний среднего уха у детей посвящена статья сотрудников Республиканского научно-практического центра оториноларингологии. Установлены лабораторные «предвестники» формирования экссудата в барабанной полости и факторы, осложняющие течение среднего отита.

Отражена и методология скрининга первичного гиперпаратиреоза, оказавшаяся приемлемой для широкого использования в практической деятельности врачей клинической лабораторной диагностики.

В связи со все более широким внедрением в работу клиничко-диагностических лабораторий технологий молекулярно-генетического исследования представляется важной статья доктора медицинских наук, профессора Костюк С.А., посвященная возможным ошибкам в выполнении всех этапов секвенирования, под которым понимается получение первичных данных о последовательностях нуклеиновых кислот.

Надеемся, что материалы очередного номера международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика Восточная Европа» окажутся востребованными специалистами клинической лабораторной службы и врачами-клиницистами в их практической и научной деятельности.

Главный редактор в Беларуси
Владимир Семенович Камышников



ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Реагенты
FENOX



Анализаторы
HUMAN



Микроскоп
HumaScope



Лабораторные
центрифуги
FENOX



ООО «Арвитмедикл» это:

- экономически эффективное сочетание цена-качество по сравнению с импортными аналогами;
- реагенты с высокими техническими характеристиками для автоматических биохимических анализаторов, а также для полуавтоматических анализаторов и мануальных исследований;
- разработанные производителем адаптационные методики для лабораторно-диагностических систем «открытого» типа для автоматических биохимических анализаторов;
- участие в государственных процедурах закупки на конкурсной основе.

Мы предлагаем:

- медицинские анализаторы и другое оборудование;
- реагенты и диагностические наборы;
- безопасные системы для взятия крови;
- расходные материалы для КДЛ;
- техническое обслуживание и ремонт лабораторного оборудования и другой медицинской техники.

МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНИКА. ИЗДЕЛИЯ
МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ. Реклама.

Производитель:
ООО «Арвитмедикл»
Отдел продаж:

Тел.: +375 17 396-38-10 (12/13/14)
Факс.: +375 17 396-38-12
Моб.: +375 44 538-77-70
+375 29 875 92 33

**Организация деятельности
клинико-лабораторной службы /
Подготовка кадров**

Камышиников В.С.

Вклад кафедры клинической лабораторной диагностики Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета в становление школы специалистов клинической лабораторной диагностики и формирование национальной клинико-лабораторной службы (по итогам осуществления ее 54-летней деятельности в системе последилового образования врачей) 189

**Коронавирусная инфекция и ее осложнения /
Оригинальные исследования**

*Перевезенцев О.А., Мамедов И.С.,
Кривикин А.И.*

Ассоциация носительства SARS-CoV-2 с уровнем гиперметилированных форм аргинина в плазме крови как новых информативных биомаркеров эндотелиальной дисфункции 209

**Коронавирусная инфекция и ее осложнения /
Лабораторный мониторинг**

Чмаз А.А., Салман Б.Д., Абдулрида Л.А.

Сравнение состояний гуморального иммунного ответа на естественную инфекцию COVID-19 и проведение «противовирусной» вакцинации 220

**Коронавирусная инфекция и ее осложнения /
Превентивная лабораторная медицина**

*Голуценко О.А., Иванова Т.А.,
Жильцов И.В., Скребло Е.И.*

Показатели липидного спектра сыворотки крови пациентов с COVID-19 как вероятные биомаркеры неблагоприятного исхода развития заболевания 226

**Клиническая инфектология и паразитология /
Лабораторные исследования в клинической
практике**

Астапов А.А., Шилейко И.Д., Гуркова А.В.

Клиническая и лабораторная диагностика малярии в условиях проявления завозной заболеваемости паразитозом в Республике Беларусь 234

**Онкогематологические заболевания /
Инновации в лабораторной диагностике
онкологических заболеваний**

Мовчан Л.В., Шман Т.В., Ивуть У.С.

Содержание лейкозных стволовых клеток в костном мозге пациентов с различными вариантами острого миелоидного лейкоза 244

**Болезни уха, горла и носа /
Оригинальные исследования**

*Юревич В.В., Корнелиус О.А.,
Шестакова Е.В., Муравейник Н.П.*

Состояние гуморального иммунитета и статус витамина D у детей с экссудативным средним отитом на этапе их подготовки к хирургическому лечению 253

**Нейроэндокринные расстройства /
Обзоры и лекции**

*Бруцкая-Степковская Е.В.,
Шепелькевич А.П.*

Первичный гиперпаратиреоз: методология скрининга и тактика клинико-лабораторного исследования пациентов групп риска 262

**Травматология и ортопедия /
Экспериментальные исследования**

Хусейн Б.Дж., Гхани Б.А.

Влияние местного применения коллагена и бета-трикальцийфосфата на заживление повреждений костной ткани 276

**Микробиология и вирусология /
Высокотехнологичные
лабораторные исследования**

*Хеаль Х.Х., Аль-Далли З.Т.,
Хадам Э.Дж.*

Антибактериальные и цитотоксические свойства наночастиц серебра с лютеолином: технология их синтеза и характеристика 287

**Микробиология и вирусология /
Экспериментальные исследования**

*Мохаммед М.М., Худор М.Х.,
Ибрагим Х.К.*

Инактивированная вакцина против *Staphylococcus aureus*: ее влияние на характер иммунновоспалительного ответа (по динамике уровня цитокинов IL6, IL4 и IgG) и лечебно-профилактическая надежность применения (экспериментальное исследование) 301

**Практикующему врачу /
Молекулярно-генетические
исследования**

Костюк С.А.

Секвенирование – технологическая часть получения первичных данных о последовательностях нуклеиновых кислот: особенности, которые следует учитывать при его осуществлении во избежание погрешностей в процедуре исследования 313

Coronavirus Infection and Its Complications / Original Researches

Perevezentsev O., Mamedov I., Krapivkin A.
Association of SARS-CoV-2 Carriage with Arginine Hypermethylated Forms Level in Blood Plasma as New Informative Biomarkers for Endothelial Dysfunction210

Coronavirus Infection and Its Complications / Laboratory Monitoring

Chmagh A.A., Salman B.D., Abdulridha L.A.
The Comparison of Antibody Responses to Natural COVID-19 Infection and Vaccination219

Coronavirus Infection and Its Complications / Preventive Laboratory Medicine

Volha A. Haliuchenka, Tatsyana A. Ivanova, Ivan V. Zhyltsou, Alena I. Screblo
Blood Serum Lipid Spectrum Parameters in COVID-19 Patients as Probable Biomarkers for Unfavorable Disease Outcome227

Clinical Infectology and Parasitology / Laboratory Research in Clinical Practice

Anatoli A. Astapov, Irina D. Shileiko, Anna V. Gurkova
Clinical and Laboratory Diagnosis of Malaria in the Context of Imported Parasitosis Incidence in the Republic of Belarus235

Oncohematological Diseases / Innovations in the Laboratory Diagnostics of Oncological Diseases

Liudmila V. Movchan, Tatsiana V. Shman, Ulyana S. Ivuts
Leukemic Stem Cell Content in the Bone Marrow of Patients with Various Types of Acute Myeloid Leukemia245

Ear, Nose and Throat Diseases / Original Researches

Yurevich V., Karnialiuk V., Shestakova E., Muraveinik N.
State of Humoral Immunity and Vitamin D Status in Children with Exudative Otitis Media at the Stage of their Preparation for Surgical Treatment254

Neuroendocrine Disorders / Reviews and Lectures

Brutskaya-Stempkovskaya E., Shepelkevich A.
Primary Hyperparathyroidism: Screening Methodology and Clinical Laboratory Testing Tactics in Risk Group Patients263

Traumatology and Orthopedics / Experimental Researches

Hussein B.J., Ghani B.A.
Effect of Local Application of Collagen and Beta-Tricalcium Phosphate on Bone Healing275

Microbiology and Virology / High-Tech Laboratory Research

Heal H.H., Al-Dallee Z.T., Khadam E.J.
Antibacterial and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles with Luteolin: Technology of Their Synthesis and Characteristics286

Microbiology and Virology / Experimental Research

Mohammed M.M., Khudor M.H., Ibraheim H.K.
Inactivated Vaccine Against Staphylococcus Aureus: Its Effect on the Nature of the Immuno-Inflammatory Response (Based on the Dynamics of the Level of Cytokines IL6, IL4 and IgG) and Therapeutic and Prophylactic Reliability of Use (Experimental Study)300

To the Practitioner / Molecular and Genetic Research

Svetlana A. Kostiuik
Sequencing is a Technological Part in Obtaining Primary Data on Nucleic Acid Sequences: Features to be Taken into Account when Performing it to Avoid Errors in the Test Procedure314



Камышников В.С.

Институт повышения квалификации и переподготовки кадров
здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета,
Минск, Беларусь

Вклад кафедры клинической лабораторной диагностики Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета в становление школы специалистов клинической лабораторной диагностики и формирование национальной клинико-лабораторной службы (по итогам осуществления ее 54-летней деятельности в системе последиplomного образования врачей)

■ ВВЕДЕНИЕ

В достижении побед над тяжелыми заболеваниями, наносящими существенный ущерб обеспечению демографической безопасности страны, большая роль принадлежит «бойцам невидимого фронта», каковыми являются врачи клинической лабораторной диагностики, осуществляющие свою благородную и весьма ответственную миссию по постановке диагноза заболевания, оценке прогноза его развития и эффективности проводимого лечения в специализированных структурных подразделениях медицинских учреждений – клинико-диагностических лабораториях.

Еще с самого начала становления лабораторной медицины стала крылатой фраза «Без анализа мочи не работают врачи». В настоящее время для выполнения клинико-лабораторных исследований широко используются и многие другие биологические жидкости, анализируемые с применением высокотехнологичного оборудования, что позволяет не только выявлять проявляемую при жизни приобретенную либо наследственную патологию, но и предсказать ее развитие уже в раннем детстве, когда отсутствуют клинические признаки заболевания.

Постигшее население всего мира испытание, вызванное пандемией коронавирусной инфекции, ярко продемонстрировало высокую лабораторно-диагностическую значимость тестов, основанных на применении технологий молекулярно-генетического, иммунохимического и других видов лабораторного анализа.

Их широкое использование стало возможным благодаря ранее осуществленной в нашей стране весьма большой работе по целенаправленной, предопределенной концепцией Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (ВНМИКЦЛД) подготовке полуторатысячной «армии» уникальных по роду своей профессиональной деятельности специалистов в плане как овладения ими широким спектром разнообразных мануальных и автоматизированных методов

лабораторного анализа, так и интерпретации получаемых при исследовании пациентов результатов.

В достижении этого оказалась особо значимой роль кафедр клинической лабораторной диагностики учреждений последиplomного образования и медицинских университетов.

20 апреля 2024 г. исполнилось 54 года со времени создания кафедры клинической лабораторной диагностики в Белорусском государственном институте усовершенствования врачей (ныне – Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «БГМУ»). Она явилась впервые созданной в системе последиplomного образования врачей в Республике Беларусь, длительное время (более 25 лет) являвшейся в стране единственной, притом существенно отличающейся по своему целевому предназначению и характеру профессиональной деятельности ее сотрудников от всех других кафедр, ранее открытых в БелГИУВ и МГМИ. Это во многом связано с тем, что осваиваемый обучающимися на кафедре предмет «клиническая лабораторная диагностика» представляет собой отрасль медицинских знаний, базирующуюся на тесной интеграционной связи медицины с фундаментальными науками – химией, физикой, биологией, генетикой и др.

Данная особенность и определила возможность выполнения врачами-лаборантами клиничко-лабораторных исследований с использованием технологий биохимического, физико-химического, микроскопического, молекулярно-биологического, молекулярно-генетического и других видов анализа.

Клиническая лабораторная диагностика в настоящее время позиционируется не только как вид профессиональной деятельности, но и как научная специальность, включенная в перечень научных специальностей Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь.

Она опирается на научный теоретический базис, позволяющий осмыслить обнаруживаемые в организме метаболические изменения в аспекте их участия в развитии заболевания, – клиническую патобиологию; методологический и методический арсенал, обеспечивающий доступ к изучению различных компонентов биологического материала, – клиническую аналитику; а также систему современных знаний о диагностической значимости изменений показателей многочисленных лабораторных тестов при разных формах патологии – клиничко-лабораторную информатику.

Известно, что благодаря деятельности специалистов клинической лабораторной диагностики практическому здравоохранению поставляется более 80% объективной информации, столь необходимой для постановки диагноза заболевания, оценки тяжести течения, эффективности проводимой терапии и прогноза его развития. Эта весьма ответственная миссия – постановка диагноза заболевания по констатации характерных для него метаболических изменений – во многом реализуется благодаря приобретению врачами клинической лабораторной диагностики знаний, умений и практических навыков на одноименных кафедрах и курсах учреждений системы последиplomного образования.

За прошедший с момента создания кафедры более чем полувековой период времени на ее базе было обучено несколько поколений врачей-специалистов, среди которых не только врачи клинической лабораторной диагностики, но и преподаватели курсов и кафедр клинической лабораторной диагностики Гомельского, Гродненского, Витебского и Белорусского государственных медицинских университетов,



преподаватели всех шести медицинских колледжей, участвующих в подготовке фельдшеров-лаборантов, научные сотрудники.

■ СТАНОВЛЕНИЕ КАДРОВОГО СОСТАВА И НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КАФЕДРЫ

Накануне открытия кафедр клинической лабораторной диагностики в БелГИУВ и институтах усовершенствования врачей всех других советских республик в СССР назрела настоятельная необходимость в проведении широкомасштабных организационных мероприятий, направленных на упорядочивание и совершенствование деятельности службы клинической лабораторной диагностики, что невозможно было осуществить без тщательно продуманной системы подготовки профессиональных кадров врачей-лаборантов (ныне – врачей клинической лабораторной диагностики).

Осуществлению иницилируемых в течение времени больших перемен в системе организации деятельности клинической лабораторной службы во многом способствовал вышедший в свет 21 января 1968 г. Приказ Министерства здравоохранения СССР № 63 «О мерах по дальнейшему развитию и совершенствованию лабораторной клинико-диагностической службы в СССР», которым предусматривалось в том числе создание кафедр клинической лабораторной диагностики во всех 18 институтах усовершенствования врачей Министерства здравоохранения СССР.

На основании этого приказа 20 апреля 1970 г. была открыта кафедра клинической лабораторной диагностики в БелГИУВ.

Уже в год открытия кафедры двумя ее первыми преподавателями – В.Г. Колбом и В.С. Камышниковым был проведен (с 16 ноября по 30 декабря 1970 г.) первый цикл тематического усовершенствования по клинической лабораторной диагностике (клинической химии).



На протяжении первого года своего существования – по 20 апреля 1971 г. – деятельность кафедры осуществлялась на базе биохимического отдела Института туберкулеза Министерства здравоохранения БССР. В течение же последующих 16 лет (1971–1987) – в структуре «новой» Дорожной больницы Белорусской железной дороги в тесном сотрудничестве с клинико-диагностической лабораторией и другими клиническими отделениями этого учреждения. На его базе в 1971 г. был проведен первый цикл специализации, притом уже с участием третьего преподавателя кафедры – Е.П. Иванова.

В этот период времени состоялось значительное расширение профессорско-преподавательского состава кафедры, что было вызвано необходимостью еще более увеличить количество обучающихся врачей-лаборантов, прибывающих на кафедру со всех уголков СССР (до распада которого БелГИУВ являлся учреждением союзного подчинения), а также ориентацией на расширение спектра видов профессиональной деятельности кафедры.

К началу 1975 г. штат кафедры включал в себя 4 преподавателя кафедры, 5 лаборантов и 1 препаратора. С приходом на кафедру ассистента А.Б. Ходюковой подготовка врачей-лаборантов стала осуществляться по всем 3 основным разделам клинической лабораторной диагностики: клинической биохимии, лабораторной гематологии, общеклиническим методам исследования.



В течение первых 10 лет (с 1971 по 1981 г.) на кафедре проводились только 5-месячные циклы специализации (ныне – переподготовки) и 4-месячные циклы общего усовершенствования (повышения квалификации) по основным профильным разделам клинической лабораторной диагностики: клинической биохимии, лабораторной гематологии, общеклиническим методам исследования. Поскольку кафедра осуществляла работу по повышению квалификации врачей-лаборантов для медицинских учреждений не только БССР, но и других республик СССР, остро встал вопрос о расширении ее преподавательского состава.

Поэтому в период времени с 1976 по 1980 г. были избраны по конкурсу еще 6 новых преподавателей: Т.С. Дальнова (октябрь 1976 г.), В.С. Данильчик (апрель 1977 г.),



Преподаватели кафедры профессор В.Г. Колб, доценты Т.С. Дальнова, Е.Т. Zubовская, О.А. Волотовская, А.Б. Ходюкова, С.Г. Василиу-Светлицкая



Л.А. Смирнова (февраль 1978 г.), Е.Т. Зубовская (март 1979 г.) и О.А. Волотовская (март 1979 г.), С.Г. Василиу-Светлицкая (декабрь 1980 г.).

В 1979 г. доцент Е.П. Иванов и ассистент Л.А. Смирнова, приобретшие на кафедре большой опыт работы в области лабораторной гематологии, вышли из ее состава для создания по решению руководства БелГИУВ новой кафедры – гематологии и трансфузиологии.

В организации работы кафедры клинической лабораторной диагностики наряду с преподавателями активное участие принимали старшие лаборанты В.М. Лукомская, С.В. Бестужева, Н.В. Калинина, Т.В. Ханецкая, Т.А. Тимошенко, Л.И. Кудин, а также лаборанты Н.П. Дударенко и Т.К. Черненко, ведущий лаборант Е.П. Гапеева.



Старшие (ведущие) лаборанты кафедры, внесшие существенный вклад в организацию деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики с начала ее создания (слева направо: В.М. Лукомская, С.В. Бестужева, Т.В. Ханецкая, Т.А. Ивко (Тимошенко), Л.И. Кудин, Н.П. Дударенко, Е.П. Гапеева)

5 марта 1987 г. решением ректората БелГИУВ кафедра была размещена в только что открытом, специально предназначенном для выполнения научных исследований корпусе ЦНИЛ, где осуществляет свою деятельность уже на протяжении 37 лет.

Весьма большой вклад в подготовку специалистов клинической лабораторной диагностики был привнесен ветеранами кафедры: заведующими кафедрой профессорами В.Г. Колбом, В.С. Камышниковым, доцентами А.Б. Ходюковой, С.Г. Василиу-Светлицкой, Т.С. Дальновой.



Ветераны кафедры (слева направо): первый заведующий кафедрой профессор В.Г. Колб (период деятельности 29 лет: с 1970 по 1999 г.), профессор В.С. Камышников (второй заведующий кафедрой (период деятельности 54 года: с 1970 по 2024 г., в должности заведующего – 26 лет); доценты кафедры А.Б. Ходюкова, С.Г. Василиу-Светлицкая, Т.С. Дальнова

Опыт их работы, отраженный к тому же в изданных кафедрой учебниках, был воспринят и приумножен следующим поколением преподавателей, в том числе доцентами Л.И. Алехнович, Л.В. Батуревич, А.Т. Кузьменко, И.Д. Шилейко.



Доценты кафедры (слева направо): Л.И. Алехнович, Л.В. Батуревич, А.Т. Кузьменко, И.Д. Шилейко

Примечательно, что трое преподавателей – Л.И. Алехнович, Л.В. Батуревич и И.Д. Шилейко – защитили диссертационные работы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по научной специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика, что само по себе предопределяет большие возможности реализации их научного потенциала в области лабораторной медицины.

■ ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КАФЕДРЫ В СОВЕТСКИЙ ПЕРИОД ВРЕМЕНИ

1. Создание профессиональной школы врачей-лаборантов на концептуальной основе, определенной директивными документами Министерства здравоохранения СССР.
2. Подготовка специалистов («спецординаторов») для работы за границей (в странах Африки и Латинской Америки) с целью осуществления экспорта образовательных и профессиональных лабораторно-диагностических услуг.
3. Информирование врачей-клиницистов (слушателей кафедр клинического профиля) о клинко-диагностической значимости изменения показателей лабораторных тестов и тактике лабораторного исследования пациентов с заболеваниями внутренних органов.

Мероприятия по подготовке кадров врачей-лаборантов и экспорту образовательных и профессиональных услуг

Магистральным направлением деятельности в области подготовки врачей-лаборантов в тот период времени явилось внедрение в практику работы всех клинко-диагностических лабораторий утвержденных Министерством здравоохранения СССР унифицированных методов исследования, приведенных в изданных в период с 1972 по 1976 г. приложениях к периодическим приказам об унификации лабораторных методов исследования. Унификация была ориентирована на привнесение единообразия в спектр используемых методов лабораторного анализа и лабораторного оборудования, а также в размерность величин, отражающих результаты клинического лабораторного исследования. Тем самым она должна была обеспечить преемственность в лабораторном исследовании пациентов.

Решение этой глобальной задачи и было возложено на кафедру клинической лабораторной диагностики БелГИУВ – единственную в системе последиplomного образования врачей-лаборантов в БССР. В реализации возложенной на кафедру миссии она далеко опередила все другие однотипные кафедры бывших республик СССР, поскольку накопленный в течение 5 лет опыт использования унифицированных



методов исследования на кафедре БелГИУВ и в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений БССР был отражен в 2 книгах В.Г. Колба и В.С. Камышникова: «Клиническая биохимия» (1976) и «Справочник по клинической химии» (1982). Изложение в этих руководствах материалов по исследованию отдельных анализов строилось по единой схеме: сведения о различных технологиях исследования → описание хода определения → трактовка результатов лабораторного исследования.

Указанные руководства по клинической химии, изданные издательством «Беларусь» большим тиражом (72 000 экз.), очень скоро стали использоваться врачами-лаборантами клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений практически всех союзных республик, оказывая к тому же реальную помощь в образовательной деятельности профессорско-преподавательскому составу других кафедр клинической лабораторной диагностики институтов усовершенствования врачей по освоению на них контингентом врачей-лаборантов унифицированных методов исследования.

Уже в начальном периоде деятельности кафедры ее сотрудниками велась подготовка клинических ординаторов и спецординаторов как специалистов в области клинической лабораторной диагностики для осуществления ими работы за границей. Большинство окончивших спецординатуру работали в Гвинее, Нигерии, Алжире, Йемене, Афганистане, Мозамбике и других странах Африки в качестве преподавателей (Борознин Ю.А., Панкратова Л.Т. и др.) и заведующих клинико-диагностическими лабораториями (Ходюкова А.Б., Королевич Н.А., Панкратова Л.Т., Прокопович А.С., Козел Е.И., Грицкевич А.Ф. и др.).

Лаборант кафедры Н.П. Дударенко в 1977 г. была командирована Министерством здравоохранения БССР в Республику Куба в качестве клинического лаборанта с целью оказания помощи в организации деятельности клинико-диагностической лаборатории. Спустя 5 лет после возвращения с Кубы в Беларусь Н.П. Дударенко была направлена Министерством здравоохранения БССР в Республику Афганистан, где на протяжении 2 лет (с 1985 по 1987 г.) осуществляла возложенную на нее ответственную миссию лаборанта-токсиколога во дворце президента республики Бабрака Кармая.

Организационная, методическая и консультационно-диагностическая деятельность кафедры

Немаловажную роль во внедрении в практическую деятельность клинико-диагностических лабораторий унифицированных методов исследования, а также технологий осуществления внутреннего и внешнего (в том числе республиканского) контроля качества, организуемого совместными усилиями Всесоюзного и Республиканского научно-методического и контрольного центров по лабораторному делу, сыграло осуществлявшееся кафедрой на протяжении 25 лет руководство деятельностью созданного в 1968 г. Республиканского организационно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (РОМКЦЛД), одними из важных направлений деятельности которого являлись оказание содействия сотрудникам лабораторий во внедрении в их практическую деятельность унифицированных методов исследования, осуществление внутреннего и внешнего контроля качества всеми клинико-диагностическими лабораториями республики, а также испытание нового лабораторного оборудования.

Кафедра, явившаяся в силу специфики своей деятельности, по сути, республиканским консультативным центром, действующим на функциональной основе, постоянно оказывала консультационную и организационно-методическую помощь клиничко-диагностическим лабораториям республики. Так, преподавателями (Е.П. Ивановым, Т.С. Дальновой) консультировались препараты мазков крови и костного мозга.

Сотрудниками кафедры, и прежде всего ее заведующим – профессором В.Г. Колбом, было принято активное участие в организации и дальнейшей деятельности Республиканского общества врачей-лаборантов, подготовке Устава научно-практического общества врачей-лаборантов, принятого затем на 1-м Республиканском съезде врачей-лаборантов.

20–21 мая 1975 г. на базе учебно-лабораторного корпуса БелГИУВ состоялся организованный кафедрой и РОМКЦЛД 1-й Республиканский съезд научного общества врачей-лаборантов.

В программу съезда было включено 90 докладов, посвященных наиболее важным проблемам лабораторной службы. В работе съезда приняло участие свыше 300 специалистов лабораторной службы республики, а также гости из Москвы, Ленинграда, Алма-Аты, Харькова и других городов.

В докладе В.Г. Колба отмечено, что в республике функционирует 988 клиничко-диагностических лабораторий, насчитывается 937 штатных должностей врачей-лаборантов и 3200 лаборантов со средним специальным образованием.

В республике по инициативе главного внештатного специалиста по клинической лабораторной службе – заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики В.Г. Колба было открыто 9 радиоизотопных лабораторий, использующих производимые на базе ХОП ИБОХ АН БССР наборы реагентов для определения гормонов.

В г. Минске была открыта централизованная серологическая лаборатория на базе кожно-венерологического диспансера, а в лаборатории 3-й городской клинической больницы г. Минска централизованно проводились исследования на токсоплазмоз.

В советский период времени кафедра традиционно являлась организатором проведения 2, 3 и 4-го съездов специалистов клинической лабораторной диагностики.

Лидирующую роль в разработке стратегии и тактики подготовки руководящих кадров, специалистов клинической лабораторной диагностики союзных республик играли: кафедра клинической лабораторной диагностики Центрального ордена Ленина института усовершенствования врачей – ЦОЛИУВ (заведующие: профессора Е.А. Кост, Е.Д. Пономарева, В.Т. Морозова); ВНИКЦЛД (научный консультант центра профессор В.В. Меньшиков); Всесоюзное научное общество врачей-лаборантов (руководитель – профессор А.С. Петрова), являвшихся к тому же соорганизаторами многих мероприятий, проводимых как в СССР, так и за его пределами.

Активное участие в проведении союзных мероприятий в области клинической лабораторной диагностики принимал и заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелГИУВ профессор В.Г. Колб, в том числе во 2-м Всесоюзном съезде врачей-лаборантов в г. Ворошиловграде, во Всесоюзном семинаре по обмену опытом централизованных клиничко-диагностических лабораторий на базе ВДНХ СССР (Москва, 1979 г.), во Всесоюзном семинаре по улучшению контроля качества клинических лабораторных исследований на базе ВДНХ СССР (Москва, 1981 г.), в работе учебно-методической конференции «Проблемы совершенствования последипломной подготовки врачей-лаборантов» (Одесса, 1984 г.).



Будучи заведующим кафедрой, В.Г. Колб принял участие в проведении 12 международных конгрессов, в организации 5 съездов и 40 пленумов общества.

Научная деятельность

Главным направлением таковой в советский период времени (до 1991 г.) явилось установление особенностей холестеринопатии и атерогенеза при легочной патологии.

На основании выполненного экспериментального (авторское свидетельство на изобретение № 1367033 (СССР). G 09 B 23/28. Способ моделирования атеросклероза. Камышников В.С., Пржелясковский Г.А., Колб В.Г.) и клинического исследования были предложены защищенные 10 авторскими свидетельствами на изобретения новые, в 3–4 раза более чувствительные, чем традиционные, способы клинико-биохимической лабораторной диагностики метаболически атипично проявляющегося атеросклероза.

По результатам клинико-экспериментального исследования была выдвинута концепция о значимости изменений биохимического состава и структурно-функциональных свойств антиатерогенных липопротеинов в формировании атипично проявляющегося атеросклероза, а также о большой диагностической значимости установления изменений в соотношении между содержанием свободного и эфиросвязанного холестерина в липопротеинах высокой плотности для выявления атеросклероза на ранних стадиях его формирования.

Научная новизна концепции подтверждена рядом авторских свидетельств на изобретения, в том числе № 1668951 (СССР). G 01 № 33192. A 61 B 10/00. Способ диагностики атеросклероза у больных пневмонией. Камышников В.С., Гуревич Г.Л., Грозовская М.С., Колб В.Г. Открытия. Изобретения. 1991. № 29.

■ ХАРАКТЕР, НАПРАВЛЕНИЯ И ИТОГИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КАФЕДРЫ В ПОСТСОВЕТСКИЙ ПЕРИОД ВРЕМЕНИ

Деятельность кафедры по подготовке профессиональных кадров и экспорту образовательных услуг

После распада СССР и приобретения республикой суверенитета наступил новый этап в образовательной деятельности кафедры, связанный с переходом от использования технологий унифицированных методов исследования (для постановки которых требовалось приготовление реагентов из исходных сухих веществ в условиях самой клинико-диагностической лаборатории) к применению уже готовых, сертифицированных наборов реагентов, предоставляемых специализированными торговыми организациями и предназначенными в основном к использованию на высокотехнологичном автоматизированном оборудовании (биохимических, гематологических, иммунологических и других автоанализаторах) вместо обычных фотоэлектроколориметров (типа ФЭК-М, ФЭК-Н-57, ФЭК-60, микроколориметра МКМФ-1).

Поэтому потребовалось кардинально перестраивать учебный процесс, внедряя в него новые, соответствующие веяниям времени методы лабораторного анализа.

Обучение специалистов на разных этапах деятельности кафедры в постсоветский период времени включало проведение курсов переподготовки и повышения квалификации по многочисленным субдисциплинам специальности «клиническая лабораторная диагностика»: клинической биохимии, лабораторной гематологии,

общеклиническим методам исследования и другим, в основу которых было положено использование в учебном процессе современных технологий клиничко-лабораторного исследования, связанных с применением высокотехнологичных, в том числе автоматизированных, методов исследования.

С целью подготовки и повышения квалификации специалистов в области химико-токсикологического анализа в 2001 г. была разработана и внедрена в учебный процесс Программа последипломного обучения врачей по химико-токсикологическому анализу веществ, вызывающих одурманивание, которая явилась основой для разработки в дальнейшем более узких программ химико-токсикологического исследования.

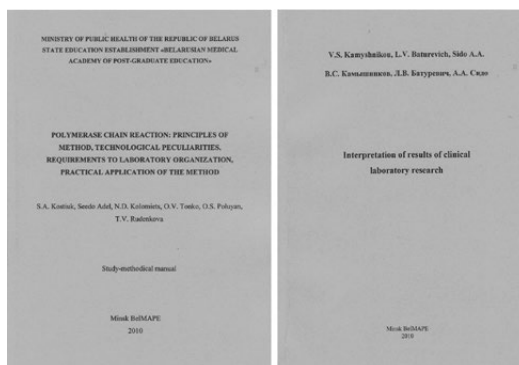
На основе разработанной с участием доцента А.Т. Кузьменко и утвержденной в ноябре 2016 г. программы «Химико-токсикологический анализ» (для заведующих клиничко-диагностических, токсикологических лабораторий, врачей лабораторной диагностики, научных сотрудников организаций здравоохранения, биологов) на кафедре клинической лабораторной диагностики БелМАПО стали 2 раза в год проводиться курсы повышения квалификации специалистов в области химико-токсикологического анализа.

По сложившейся традиции и в постсоветском периоде деятельности кафедрой уделялось должное внимание экспорту образовательных услуг. Так, в соответствии с международной договоренностью на кафедре прошли обучение (в течение 8 месяцев) специалисты из Социалистической Народной Ливийской Арабской Джамахирии.



Представители контингента врачей лабораторной диагностики из Ливии: на кафедре (фото слева) и в Минском консультативном лечебно-диагностическом центре (фото справа)

Специально для обучения стажеров из Ливии были подготовлены и изданы 2 руководства на английском языке.





Редакционно-издательская деятельность

В постсоветский период времени была продолжена и притом значительно расширена редакционно-издательская деятельность кафедры, ориентированная на оказание практической помощи врачам в области освоения технологий лабораторного исследования и трактовки полученных при их использовании результатов.

Совершенствованию подготовки профессиональных кадров во многом способствовало издание 6 издательствами Белоруссии и России, а именно: «Беларусь», «Беларуская навука», «Вышэйшая школа», «Интерпрессервис» УП «Книжный дом», «Адукацыя і выхаванне» (Беларусь, Минск), «МЕДпресс-информ» (Россия, Москва) – 57 книг (среди них 12 учебников и учебных пособий с грифом Министерства образования) общим тиражом свыше 203 000 экземпляров, которыми охватываются различные области клинической лабораторной диагностики.

Все изданные кафедрой в нашей стране и Российской Федерации учебники, учебные пособия, справочники и монографии стали настольными руководствами для специалистов клинической лабораторной диагностики не только в Беларуси, но и в России и ряде других стран СНГ. Среди них учебники, учебные пособия, справочники и другие, предназначенные как для специалистов клинической лабораторной диагностики, так и для врачей-клиницистов (врачей общей практики, кардиологов, терапевтов, хирургов, онкологов, гепатологов и др.).

Изданные руководства (учебники, учебные пособия с грифом Министерства образования Республики Беларусь, монографии, справочники) охватывают такие основные разделы предмета «клиническая лабораторная диагностика», как:

1. Техника выполнения лабораторных работ в медицинской практике:
 - Камышников В.С. Техника лабораторных работ: учебник. Минск: Беларуская навука, 2001. 286 с.
 - Камышников В.С. Техника лабораторных работ в медицинской практике. 4-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ, 2016. 344 с.: ил.
2. Технологии клинико-биохимической диагностики:
 - Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Минск: Беларусь, 2002. 495 с.: ил.
 - Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник: в 2 т. Минск: Интерпрессервис: Книжный дом, 2003. 495 с.: ил.
 - Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 2-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.; М.: МЕДпресс-информ, 2009. 889 с.
3. Методы клинико-лабораторных исследований:
 - Методы клинических лабораторных исследований: учеб. пособие / В.С. Камышников, О.А. Волотовская, А.Б. Ходюкова, Т.С. Дальнова, С.Г. Василиу-Светлицкая, Е.Т. Зуювская, Л.И. Алехнович. Минск: Белорусская наука, 2001. 695 с.; Минск: Белорусская наука, 2002. 775 с.
 - Методы клинических лабораторных исследований: учебник / В.С. Камышников, О.А. Волотовская, А.Б. Ходюкова, Т.С. Дальнова, С.Г. Василиу-Светлицкая, Е.Т. Зуювская, Л.И. Алехнович. М.: МЕДпресс-информ. Претерпело 10 изданий (с дополнениями): 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 752 с.; 4-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2011. 752 с.; 5-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 752 с.; 6-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 752 с.; 7-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2015.

- 752 с.; 8-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2017. 752 с.; 9-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2018. 752 с.; 10-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2020. 736 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика:
 - Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований): учеб. пособие / В.С. Камышников, Л.И. Алехнович, С.Г. Василиу-Светлицкая, Т.С. Дальнова, А.Б. Ходюкова, Е.Т. Зубовская, А.Т. Кузьменко, Н.Н. Кохнович, Ю.И. Степанова, Л.В. Батуревич; под ред. проф. Камышникова В.С. М.: МЕДпресс-информ, 2015. 720 с.; М.: МЕДпресс-информ, 2017. 720 с.; М.: МЕДпресс-информ, 2020. 720 с.; 4-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2023. 720 с.
 5. Лабораторная гематология:
 - Атлас по гематологии. Практическое пособие по морфологической и клинической диагностике / пер. с англ. Т.С. Дальновой, С.Г. Василиу-Светлицкой; под общ. ред. проф. В.С. Камышникова. М.: МЕДпресс-информ, 2010. 207 с.
 - Гемостазиология в клинической и лабораторной практике: пособие / В.С. Камышников [и др.]. Минск : Адукацыя і выхаванне, 2011. 320 с.: ил.
 6. Атерогенные поражения органов сердечно-сосудистой системы:
 - Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца: учеб. пособие / В.С. Камышников, Л.И. Алехнович, А.Т. Кузьменко. Минск: Образование и воспитание, 2009. 152 с.
 - Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца (предикторы осложнений и мониторинг метаболических нарушений): учеб. пособие / В.С. Камышников, Л.И. Алехнович, А.Т. Кузьменко. Минск: Образование и воспитание, 2015. 360 с.
 7. Диагностика употребления психоактивных веществ с использованием методов химико-токсикологического анализа:
 - Клиничко-лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ: учеб. пособие / В.С. Камышников, И.Д. Шилейко, А.М. Чубуков, А.Т. Кузьменко, Д.А. Статкевич. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2016. 376 с.: ил.
 8. Онкологические заболевания, диагностика и мониторинг:
 - Камышников В.С. Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов. М.: МЕДпресс-информ, 2011. 128 с.: ил.
 9. Заболевания органов гепатобилиарной системы:
 - Камышников В.С. Клиничко-лабораторная диагностика заболеваний печени. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 96 с.: ил.; 2014. 96 с.: ил.
 10. Понятие «норма» в лабораторной медицине:
 - Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь: справ. пособие для мед. работников / А.А. Чиркин, Э.А. Доценко, В.С. Камышников, В.С. Улащик, Г.М. Костин, С.П. Козловская, А.А. Чиркина, Е.Н. Нехайчик, Н.Н. Васильева, А.А. Сидо; под ред. В.С. Улащика. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2010. 88 с.
 - Камышников В.С. Норма в лабораторной медицине: справочник. М.: МЕДпресс-информ, 2014. 336 с.
 11. Справочник по диагностическим тестам:
 - Более 350 тестов. Немедленные ответы на ваши вопросы: справочник по диагностическим тестам / Д. Николь, С.Дж. Макфи, М. Пиньон, Ч. Марк Лу; пер. с англ. 2-е изд., перераб. и доп.; под общ. ред. проф. В.С. Камышникова. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 560 с.



12. Карманный справочник врача по клинической лабораторной диагностике:
 - Камышников В.С. Карманный справочник врача по лабораторной диагностике. Минск: Беларуская навука, 2002. 463 с.
 - Карманный справочник по диагностическим тестам. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 464 с.: ил.; 2007. 400 с.; 2008. 400 с.; 2012. 400 с.; 2013. 400 с.
13. Клинико-лабораторная диагностика для врачей:
 - Камышников В.С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней: учеб. пособие. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. 584 с.: ил.
 - Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2014. 632 с.: ил.
 - Камышников В.С. Лабораторная диагностика в клинической практике врача. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2018. 464 с.: ил.
14. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней:
 - Камышников В.С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней: учеб. пособие. Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. 584 с.: ил.
15. Клинико-лабораторная диагностика от «А» до «Я»:
 - Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: справ. пособие. М.: МЕДпресс-информ, 2005. 320 с.; 5-е изд. 2014. 320 с.
16. Лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии:
 - Лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии / Камышников В.С., Де-нежкина Н.В. М.: МЕДпресс-информ, 2021. 300 с.
17. Клинико-лабораторная диагностика для представителей населения – немедиков:
 - Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы: справ. пособие. Минск: Беларуская навука, 1997. 180 с.; 1998. 180 с.
 - Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы: справ. пособие. М.: МЕДпресс-информ, 2005. 176 с.; М.: Медпрессинформ, 2009. 224 с.; М.: Медпрессинформ, 2013. 304 с.

Благодаря обеспечению этой и другой учебной литературой слушателей каждого курса повышения квалификации и переподготовки была существенно повышена эффективность учебного процесса, поскольку материал изданных руководств соответствовал тематике лекционных и практических занятий кафедры.

Весьма значимым событием в деятельности службы клинической лабораторной диагностики и подготовке кадров специалистов лабораторной медицины явилась организация выхода в свет с начала 2012 г. (с периодичностью 1 раз в квартал) международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика Восточная Европа», главным редактором которого от Беларуси на протяжении всех лет его издания является заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики доктор медицинских наук, профессор В.С. Камышников.

Международный (Беларусь – Россия) научно-практический журнал «Лабораторная диагностика Восточная Европа» одобрен ВАК Республики Беларусь, включен в международные базы данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, РИНЦ. Учредитель журнала в Беларуси – УП «Профессиональные издания». Предназначен для специалистов лабораторной медицины, терапевтов, хирургов, кардиологов, эндокринологов, гематологов, дерматовенерологов, представителей других клинических специальностей, биологов.



В период с 2012 г. по настоящее время выпущено 46 номеров журнала (с ноября 2021 г. журнал вошел в международную базу данных Scopus). Основным предназначением журнала является освещение многогранных направлений деятельности клиничко-лабораторной службы и сосредоточение внимания ее специалистов на актуальных вопросах лабораторной медицины.

Журнал явился своеобразной трибуной для актуализации животрепещущих вопросов, касающихся деятельности клиничко-лабораторной службы. Так, уже в первых номерах этого журнала появились статьи на темы, которые не могли не привлечь внимания аудитории специалистов, среди которых:

Камышников В.С. Национальная служба клиничко-лабораторной диагностики: пути развития в современных условиях. 2012. № 1.

Камышников В.С. Стратегия подготовки профессиональных кадров службы клиничко-лабораторной диагностики в Республике Беларусь: проблемы и пути их решения. 2012. № 2.

Камышников В.С. Стажировка как основополагающий этап последипломного образования врачей, специализирующихся в области клиничко-лабораторной диагностики. 2012. № 4.

Решение кадровых вопросов и профессиональная подготовка квалифицированных специалистов лабораторной службы Украины на современном этапе / А.Г. Лунева, Е.П. Завадецкая, Л.И. Погорелая. 2013. № 1.

Камышников В.С. Проблемы организации деятельности Республиканского центра клиничко-лабораторной диагностики на современном этапе. 2013. № 1.

Итоги межлабораторного контроля качества клиничко-лабораторных исследований, выполненных в Республике Беларусь в 2012 г. / Е.Т. Зубовская, В.С. Камышников. 2012. № 3.

Лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ с использованием разработанных и внедренных в практику здравоохранения унифицированных методов исследования / В.С. Камышников, А.М. Чубуков, И.Д. Шилейко. 2013. № 4.

Национальная система клиничко-лабораторной диагностики: пути повышения эффективности и обеспечения качества выполнения лабораторно-диагностических исследований / В.С. Камышников, Г.М. Костин. 2014. № 1.



Практика аккредитации медицинских лабораторий: требования, критерии, процедура / А.Г. Лунева, М.Ш. Абди. 2015. № 1.

Затронутые и многие другие темы освещались в соответствующей рубрике многих других выпусков журнала.

Участие кафедры в организационно-методической работе

Кафедрой на протяжении всего периода ее деятельности особое внимание уделялось вопросам организации клинико-лабораторной службы в Республике Беларусь, что нашло отражение в изданных учебно-методических пособиях, среди которых:

Камышников В.С. Организация клинической лабораторной службы: учеб. пособие / БелМАПО. Кафедра КЛД. Минск, 2001. 40 с. Тираж 100 экз.

Камышников В.С. Организация клинической лабораторной службы: учеб. пособие / БелМАПО. Кафедра КЛД. Минск, 2002. 40 с. Тираж 100 экз.

Камышников В.С. Организация клинической лабораторной службы: учеб. пособие / БелМАПО. Кафедра КЛД. Минск, 2003. 40 с. Тираж 100 экз.

Организация клинической лабораторной службы: метод. указания / В.С. Камышников, Н.Л. Сергейчик, Е.Т. Зубовская. Минск: БелМАПО: РЦКЛД, 2008. 122 с. Тираж 230 экз.

Организация клинической лабораторной службы: практ. руководство / В.С. Камышников, Н.Л. Сергейчик, Е.Т. Зубовская. Минск: БГУФК, 2009. 139 с.

Организация клинической лабораторной службы: практ. пособие / В.С. Камышников, Н.Л. Сергейчик, Е.Т. Зубовская; БелМАПО, РЦКЛД. Минск: БГУФК, 2011. 132 с.

Организация клинической лабораторной службы: практ. пособие / В.С. Камышников, Е.Т. Зубовская; БелМАПО, РЦКЛД. Минск: БГУФК, 2013. 137 с.

Организация клинической лабораторной службы: практ. пособие / В.С. Камышников, Е.Т. Зубовская. 2-е изд., перераб. и доп. Минск: БГУФК, 2013. 196 с.

Организация клинико-лабораторного обеспечения лечебно-профилактической деятельности медицинских учреждений Республики Беларусь: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников, Л.В. Батуревич, Л.И. Алехнович, А.Т. Кузьменко. Минск: БелМАПО, 2018. 77 с.

Организационно-методическое сопровождение лабораторно-диагностической деятельности медицинских учреждений Республики Беларусь: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников [и др.]. Минск: БелМАПО, 2019. 87 с.

Камышников В.С. Становление лабораторной медицины в Республике Беларусь. Минск: БелМАПО, 2021. 177 с.

Камышникова В.С. Организационно-методическое и лабораторное обеспечение диагностики неотложных состояний, технологии экспресс-анализа: учеб.-метод. пособие. Минск: БелМАПО, 2022. 54 с.

Нормативно-правовые акты и документы Министерства здравоохранения Республики Беларусь, регламентирующие деятельность клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников, Л.В. Батуревич, Л.И. Алехнович, Т.С. Дальнова, А.Т. Кузьменко, И.Д. Шилейко. Минск: БелМАПО, 2022. 59 с.

Организационно-методическое обеспечение системы управления качеством клинико-лабораторных исследований и аккредитации областей деятельности медицинских лабораторий: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников, И.Д. Шилейко, А.Т. Кузьменко, А.А. Русак, А.В. Выдрицкий. Минск: БелМАПО, 2022. 118 с.

На всех этапах своей деятельности кафедра играла главенствующую роль в аттестации специалистов клинической лабораторной диагностики на вторую, первую и высшую квалификационные категории.

Усилиями сотрудников кафедры уже в первые годы постсоветского периода был подготовлен и издан перечень аттестационных вопросов на квалификационные категории.

В 1991 г. вышло подготовленное кафедрой издание «Тестовые вопросы для аттестации врачей-лаборантов клиничко-диагностических лабораторий» (разработчики: В.Г. Колб, В.С. Камышников, В.С. Данильчик, Е.Т. Зубовская, Т.С. Дальнова, С.Г. Светлицкая, О.А. Волотовская, А.Б. Ходюкова). Минск: БелГИУВ, 1991. 67 с. Тираж 300 экз.

В 1994 г. издан сборник тестовых вопросов «Автоматизированная аттестационная система. Клиническая лабораторная диагностика» (авторский коллектив: Колб В.Г., Камышников В.С., Зубовская Е.Т., Дальнова Т.С., Светлицкая С.Г., Волотовская О.А., Буглова С.Е., Коломиец Н.Д., Черновецкий М.А., Ключкина Л.Б., Кукулянский В.В., Соколовская А.Д.). Минск: МВГП «БелТест», 1994. 147 с. Тираж 800 экз.

В 1998 г. издан сборник тестовых вопросов «Клиническая лабораторная диагностика. Автоматизированная аттестационная система» (авторский коллектив: Колб В.Г., Камышников В.С., Зубовская Е.Т., Дальнова Т.С., Светлицкая С.Г., Ходюкова А.Б., Буглова С.Е., Коломиец Н.Д., Черновецкий М.А., Ключкина Л.Б., Кукулянский В.В., Соколовская А.Д.). Минск: БелГИУВ, 1998. 339 с.

В 2017 г. вышло 3 сборника тестовых вопросов для аттестации врачей на вторую (88 с.), первую (90 с.) и высшую (95 с.) категории: «Автоматизированная аттестационная система «Клиническая лабораторная диагностика». Минск: БелМАПО. Тираж 300 экз., 100 экз., 100 экз. соответственно.

В 2021 г. преподавателями кафедры представлена в аттестационную комиссию Министерства здравоохранения Республики Беларусь новая, актуализированная компьютерная версия тестов для сдачи квалификационного экзамена на вторую, первую и высшую квалификационные категории.

На основании постановлений и приказов Министерства здравоохранения Республики Беларусь преподаватели кафедры являлись и являются членами аттестационной подкомиссии республиканской аттестационной комиссии по присуждению соответствующих квалификационных категорий: с 2021 г. председателем аттестационной подкомиссии является заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики профессор В.С. Камышников, секретарем комиссии – доцент Л.И. Алехнович.

Участие кафедры в подготовке кадров высшей научной квалификации

Кафедра на протяжении всего времени своего существования участвовала в подготовке не только профессиональных, но и научно-педагогических кадров высшей квалификации.

В 1999 г. заведующим кафедрой (профессором В.С. Камышниковым) были разработаны 2 паспорта научной специальности 14.00.46 (в дальнейшем – 14.03.10) – клиническая лабораторная диагностика: один по отрасли «медицинские науки», другой – «биологические науки»; тем самым была создана возможность защиты диссертационных работ по новой для республики научной специальности, а при кафедре была открыта очная и заочная аспирантура по данной специальности.



В открытом в 2001 г. при БелМАПО (с участием руководителя кафедры, являвшегося в то же время проректором по научной работе) совете по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика – были защищены диссертационные работы не только профессиональными работниками службы клинической лабораторной диагностики, но и представителями других клинических специальностей, работающих в области практического здравоохранения: терапии, хирургии, эндокринологии, кардиологии, пульмонологии, в том числе иностранными гражданами с Ближнего Востока.

В сентябре 2001 г. состоялась первая в совете защита докторской диссертации заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики Витебского государственного медицинского университета Кирпиченок Л.Н. по научной специальности «клиническая лабораторная диагностика».

В соответствии с решением коллегии Министерства здравоохранения Республики Беларусь о подготовке специалистов в области химико-токсикологического анализа наркотиков и психотропных веществ под руководством заведующего кафедрой были успешно выполнены и защищены 3 кандидатские диссертации по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика – на тему о профилактике наркомании:

О.М. Вергун «Экспресс-метод определения опийных алкалоидов и особенности изменения лабораторных показателей метаболизма при отравлении наркотическими средствами»;

И.Д. Шилейко «Лабораторная диагностика употребления метадона и значимость его мониторинга при осуществлении заместительной метадоновой терапии» (Городской наркологический диспансер г. Минска);

Л.Н. Боровиковой «Лабораторно-диагностическая значимость комплексной оценки показателей метаболизма этанола и биогенных моноаминов при хронической алкогольной интоксикации».

Полученные авторами новые результаты нашли отражение в 6 Инструкциях по применению унифицированных методик определения наркотиков и психотропных веществ, созданных с участием А.М. Чубукова и других сотрудников химико-токсикологической лаборатории Минского городского наркологического диспансера.

Тем самым был внесен определенный вклад в реализацию программы преодоления пьянства и наркомании в стране.

За время существования совета в Республике Беларусь защищены 3 докторские и 36 кандидатских диссертаций по научной специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Научно-практическая деятельность, связанная с созданием и внедрением импортозамещающих и инновационных технологий

В постсоветский период времени выбор направлений научных исследований был инициирован объективными условиями, сложившимися после распада СССР: он сводился к созданию импортозамещающих и инновационных технологий исследования в области лабораторной медицины.

Так, вызванное распадом СССР прекращение поставки в нашу страну из Российской Федерации реагентов, необходимых для выполнения лабораторных исследований, привело к простаиванию лабораторного оборудования и практически

полному прекращению выполнения лабораторных исследований в лечебно-профилактических учреждениях страны. Единственным социально-экономически целесообразным путем выхода из создавшейся ситуации явилась реализация совместными усилиями сотрудников кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ, аналитической химии БГУ и структурных подразделений ИБОХ НАН Беларуси заданий, финансируемых целевым назначением тем НИР, направленных прежде всего на импортозамещение. Среди них:

задание ГНТП «Здоровье»: «Разработка технологии производства и клиничко-лабораторного применения реактивов, наборов реагентов для биохимических исследований в клинической лабораторной практике». Срок выполнения 1993–1995 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ. Задание было завершено разработкой и организацией производства на базе созданного при кафедре аналитической химии БГУ Научно-технического кооператива «НТК Анализ Х» наборов реагентов 14 наименований для выполнения основного спектра лабораторных исследований, весьма востребованных практическим здравоохранением;

задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать лабораторно-диагностические тест-системы для экспресс-определения компонентов крови и мочи с использованием ферментной технологии и освоить их производство». Срок выполнения 1996–1997 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ;

задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать ферментативные лабораторно-диагностические тест-системы для определения активности глутаматдегидрогеназы, оксibuтиратдегидрогеназы (ЛДГ-1), креатинкиназы, мочевины, мочевой кислоты методами кинетического анализа и освоить их производство». Срок выполнения 1998–1999 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ;

задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать и внедрить технологию производства импортозамещающих растворов для гематологических полуавтоматических и автоматических анализаторов зарубежного производства». Срок выполнения 1998–2000 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ;

задание ГНТП «Медицинская техника»: «Разработка универсального высокочувствительного флуориметра для клинической лабораторной диагностики». Срок выполнения 1997–1999 гг. Научный руководитель профессор В.С. Камышников;

задание ГНТП «Лечебно-диагностические технологии»: «Разработать лабораторно-диагностические тест-системы и освоить производство наборов реагентов для определения активности гамма-глутамилтранспептидазы, билирубина, холестерина, фосфора, магния, железа, общей и латентной железосвязывающей способности сыворотки крови». Срок выполнения 2001–2002 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелМАПО; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ.

Выполнен и ряд инновационных проектов (ИП):

ИП по разработке и созданию отечественного ротационного вискозиметра (на базе Института тепломассообмена им. Лыкова НАН Беларуси). Срок выполнения 1991–1992 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ;



ИП «Разработать технологии и организовать производство наборов реактивов для иммунологического анализа (ИФА) гормонов, регулирующих репродуктивную функцию женщины (эстриол, хорионический гонадотропин)». Срок выполнения 1998–2000 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель доктор хим. наук О.В. Свиридов, ИБОХ НАН Беларуси;

ИП «Разработать технологии и организовать производство наборов реактивов для иммуноферментного анализа (ИФА) комплекса стероидных гормонов (кортизол, тестостерон, эстрадиол, прогестерон)». Срок выполнения 1999–2001 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель доктор хим. наук О.В. Свиридов, ИБОХ НАН Беларуси;

ИП «Разработать тест-систему для иммуноферментного анализа сывороточного ферритина и организовать производство. Оптимизировать на основе созданной тест-системы программы скрининга и мониторинга железодефицитных состояний у населения Республики Беларусь». Срок выполнения 2000–2001 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелГИУВ; ответственный исполнитель Л.А. Смирнова, БелГИУВ).

Разработке перспективных к использованию тест-систем были посвящены также: задание БРФФИ «Разработать тест-систему для экспрессного определения общего антиоксидантного статуса организма и использовать ее для оценки эффективности антиоксидантной терапии при различных патологиях». Срок исполнения 2002–2003 гг. Научный руководитель В.С. Камышников;

задание ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» – «Жидкие реагенты». Срок выполнения 2006–2010 гг. Научный руководитель В.С. Камышников, БелМАПО; ответственный исполнитель Е.М. Рахманько, БГУ.

На основании результатов выполнения этих заданий создано отечественное производство более 60 видов наборов реагентов на базе как НТПК «Анализ Х» БГУ, а также Хозрасчетного опытного предприятия Института биоорганической химии (ХОП ИБОХ) НАН Беларуси.

Наряду с традиционно используемыми, созданы тест-системы, представленные на Ярмарке инновационных разработок БелИСА (2016), признанные Государственным комитетом по науке и технологиям инновационными и вошедшие в Каталоги инновационных разработок 2016 и 2022 гг.:

набор реагентов «Тест-система для скрининга биологических жидкостей и фармацевтических на антиоксидантную активность «ОксиСтат»;

набор реагентов «Тест-система для определения активности панкреатической фосфолипазы А2».





<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.2.001>



Перевезенцев О.А.^{1,2}✉, Мамедов И.С.², Крапивкин А.И.²

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого, Москва, Россия

Ассоциация носительства SARS-CoV-2 с уровнем гиперметилованных форм аргинина в плазме крови как новых информативных биомаркеров эндотелиальной дисфункции

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор материала, написание текста – Перевезенцев О.А.; концепция и дизайн исследования, написание текста – Мамедов И.С.; редактирование, общее руководство работой – Крапивкин А.С.

Финансирование: исследование не имело финансовой поддержки.

Подана: 23.01.2024

Принята: 09.04.2024

Контакты: pzpo@mail.ru

Резюме

Введение. Инфекция SARS-CoV-2 (COVID-19) и вызванные ею отдаленные последствия в виде нарушения состояния метаболических и физиологических процессов в настоящее время составляют весьма важную медицинскую проблему. Одной из особенностей SARS-CoV-2 является то, что в ряде случаев у пациентов не наблюдается симптомов респираторного заболевания, но при этом вирус SARS-CoV-2 определяется методами молекулярно-генетической диагностики. Ключевым звеном этиопатогенеза COVID-19 является эндотелиальная дисфункция, о состоянии и выраженности которой представляется возможным судить на основании результатов, получаемых с использованием нового информационного теста – определения гиперметилованных форм аргинина.

Цель. Установление предполагаемой ассоциации носительства SARS-CoV-2 с гиперметилованными формами аргинина (маркерами эндотелиальной дисфункции) – асимметричного диметиларгинина (АДМА) и симметричного диметиларгинина (СДМА).

Материалы и методы. Были обследованы 220 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, у которых на момент сдачи биоматериала и в течение двух недель после его забора не выявлялось клинически выраженных симптомов респираторного заболевания, характерных для COVID-19. Молекулярно-генетическая диагностика SARS-CoV-2 проводилась методами RT-PCR с ручным и автоматическим выделением вирусной РНК с использованием набора «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («Вектор Бест», Россия). У пациентов с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2 и отрицательным (группа контроля) методом ВЭЖХ-МС определялись уровни гиперметилованных форм аргинина АДМА и СДМА.

Результаты. Положительный результат методом ПЦР SARS-CoV-2 был выявлен у 52 индивидуумов (23,6%). Среди всех представителей общей выборки оказалось

60 контактных пациентов (положительный результат выявлен у 29 человек (56%), 110 медицинских работников (положительный результат выявлен в 6 случаях, или 5%) и 50 контактных медицинских работников (положительный результат в 17 случаях, или 34%). В группе бессимптомных пациентов с положительным ПЦР-тестом на SARS-CoV-2 уровни АДМА и СДМА были достоверно повышены (173 ± 15 мкг/л и 161 ± 13 мкг/л соответственно) по сравнению с группой контроля индивидиумов с отрицательным результатом ПЦР на SARS-CoV-2 (78 ± 9 мкг/л и 57 ± 8 мкг/л соответственно).

Заключение. Полученные результаты позволяют судить о том, что даже при носительстве SARS-CoV-2 имеет место эндотелиальная дисфункция, которая может определяться с помощью соответствующих метаболических маркеров. Таким образом, даже в случае носительства вируса SARS-CoV-2 проявляются эндотелиальные нарушения как одни из ключевых факторов этиопатогенеза новой коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, носительство, ПЦР, ГХ-МС, гиперметилированные формы аргинина

Perevezentsev O.^{1,2}✉, Mamedov I.², Krapivkin A.²

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Scientific and Practical Center for Specialized Medical Care for Children named after V.F. Voyno-Yasenetsky, Moscow, Russia

Association of SARS-CoV-2 Carriage with Arginine Hypermethylated Forms Level in Blood Plasma as New Informative Biomarkers for Endothelial Dysfunction

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, material collecting, text writing – Perevezentsev O.; study concept and design, text writing – Mamedov I.; editing, general supervision – Krapivkin A.

Funding: the study had no sponsor support.

Submitted: 23.01.2024

Accepted: 09.04.2024

Contacts: pzp@mail.ru

Abstract

Introduction. SARS-CoV-2 (COVID-19) infection and its long-term consequences such as disruption of metabolic and physiological processes currently constitute a very important medical issue. One of SARS-CoV-2 features is that in some cases patients do not present respiratory disease symptoms, but yet SARS-CoV-2 virus is detected by molecular genetic diagnostic methods. The key element in COVID-19 etiopathogenesis is endothelial dysfunction, the state and severity of which can be assessed by using results of a new information test: determination of hypermethylated arginine forms.

Purpose. To establish a putative association of SARS-CoV-2 carriage with hypermethylated arginine forms (endothelial dysfunction markers) such as asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA).



Materials and methods. A total of 220 patients aged 18 to 65 years who had no clinically evident symptoms of respiratory disease characteristic for COVID-19 at the time of biomaterial sampling and within two weeks after sampling were examined. Molecular genetic diagnosis of SARS-CoV-2 was carried out by RT-PCR with manual and automatic isolation of viral RNA using the RealBest RNA SARS-CoV-2 kit (Vector Best, Russia). In both SARS-CoV-2 PCR positive and SARS-CoV-2 PCR negative (control group) patients, hypermethylated arginines ADMA and SDMA levels were determined by HPLC-MS.

Results. SARS-CoV-2 PCR positivity was detected in 52 individuals (23.6%). In the total sample, there were 60 contact patients (positive result was detected in 29 cases (56%)), 110 medical workers (positive result was detected in 6 cases (5%)), and 50 contact medical workers (positive result was detected in 17 cases (34%)). In the group of asymptomatic SARS-CoV-2 PCR positive patients ADMA and SDMA levels were significantly increased (173 ± 15 $\mu\text{g/L}$ and 161 ± 13 $\mu\text{g/L}$, respectively) compared to the control group of SARS-CoV-2 PCR negative individuals (78 ± 9 $\mu\text{g/L}$ and 57 ± 8 $\mu\text{g/L}$, respectively).

Conclusion. The results obtained suggest that even in SARS-CoV-2 carriage, endothelial dysfunction occurs, which can be determined using appropriate metabolic markers. Thus, even in the case of SARS-CoV-2 virus carriage, endothelial disorders appear as one of the key factors involved in etiopathogenesis of the new coronavirus infection.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, carriage, PCR, GC-MS, hypermethylated forms of arginine

■ ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы (CoV) (Coronaviridae) – семейство вирусов, содержащих в качестве наследственного материала одноцепочечную (+) РНК со специфическими гликопротеидными шипами (спайками) вокруг вирусного капсида, которые при электронном микрокопировании похожи на солнечную корону [1]. Семейство коронавирусов делится на несколько подсемейств, включающих четыре рода (от альфа до дельта), которые потенциально патогенны для различных видов млекопитающих, включая человека [2]. За последние 20 лет, кроме ранее известных четырех видов коронавирусов у человека, входящих в структуру сезонных ОРВИ, были описаны новые, более патогенные виды данного семейства, а именно: SARS-CoV (подрод Sarbecovirus), описанный в 2002 году и ставший в 2002–2003 годах причиной вспышки атипичной пневмонии (тяжелый острый респираторный синдром – ТОРС, SARS) в Китае; MERS-CoV (подрод Merbecovirus), который в 2012 году вызвал вспышку ближневосточного респираторного синдрома в Саудовской Аравии и в 2015 году – в Южной Корее (MERS), а также новый коронавирус SARS-CoV-2 (как и вирус атипичной пневмонии, относящийся к подроду Sarbecovirus), который вызвал вспышку болезни, названной COVID-19, в китайской провинции Ухань, перешедшей в настоящее время в глобальную пандемию [3]. Достаточно высокая степень трансмиссии нового коронавируса (среднее медианное значение индекса репродукции 2,2, разброс 3,3–5,47), его способность, в отличие от вируса SARS-CoV, передаваться от человек к человеку и потенциальная тяжесть последствий заболевания COVID-19, вызываемого данным вирусом, превратили его в острейшую проблему медицины [4].

Изучение механизмов проявления патогенности коронавируса SARS-CoV-2 показало, что в клетки человека он проникает через рецепторы к ангиотензинпревращающему ферменту 2-го типа (АПФ2, ACE2), который достаточно широко представлен в различных тканях: он экспрессируется в легких на уровне альвеол, в кишечнике, гонадах, почках и т. д. [5]. Поэтому при новой коронавирусной инфекции потенциально могут поражаться не только дыхательные пути, но и другие ткани и органы [1, 5, 6]. С диагностической точки зрения это означает, что вирус может обнаруживаться не только в биологическом материале из дыхательных путей (назофарингеальные соскобы, БАЛ, мокрота), но и в других биологических жидкостях (фекалии, моча, кровь) [1, 5, 7, 8]. Теоретически он может обнаруживаться также в моче и в семенной жидкости у мужчин, хотя исследования последнего времени этого не подтверждают [1].

В настоящее время специфическими методами диагностики новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 являются молекулярно-генетические, в частности в качестве референсного используется метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией вирусной РНК [9]. Базисной лабораторной платформой для ПЦР-диагностики новой коронавирусной инфекции является рекомендованная ВОЗ тест-система, в которой используются праймеры к генам SARS-CoV РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) и капсидного белка (Е), то есть данная тест-система основана на детекции специфичной для РНК последовательности двух компонентов вируса [10]. Это связано с тем, что диагностические ПЦР тест-системы, основанные на выявлении специфической последовательности только одного компонента (Е гена) SARS-CoV-2, являются более чувствительными, чем основанные на выявлении RdRp. Но при этом может быть затруднена интерпретация результата из-за высокой сказываемости на качестве ПЦР сторонних факторов [11]. Также для ПЦР-диагностики в реальном времени новой коронавирусной инфекции могут применяться тест-системы, которые содержат праймеры к двум локусам вирусного нуклеокапсида (N1 и N2) и гену человеческой РНКазы Р [9].

Из-за стремительного распространения нового коронавируса по миру важное значение приобретает максимально широкий охват молекулярно-генетическим тестированием на SARS-CoV-2 населения различных стран для эффективного проведения противоэпидемических мероприятий и оперативное и точное проведение специфической лабораторной диагностики [9]. Метод RT-PCR является достаточно долгим и ограничен применением только в стационарной молекулярно-генетической лаборатории. Поэтому для ускорения молекулярно-генетической диагностики SARS-CoV-2 был предложен другой метод, основанный на петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией вирусной РНК (метод LAMP) [12]. В нем для детекции вирусной РНК используются 6 праймеров к генам *orf1ab*, *S* и *N*. Преимуществом данного метода является небольшая продолжительность получения результата (до 30 минут) и достаточно высокая аналитическая чувствительность (80 копий/мл). Предполагалось, что более высокая чувствительность метода LAMP может быть критически важна для выявления бессимптомных носителей SARS-CoV-2, а также пациентов в инкубационном периоде [13]. К сожалению, в настоящее время показано, что системы, основанные на методе LAMP, имеют, по сравнению с ПЦР в реальном времени, гораздо более низкую чувствительность и специфичность к выявлению SARS-CoV-2 даже в фазе активного инфекционного процесса с ярко выраженной симптоматикой [14].



Эпидемиологические исследования показывают, что носители новой коронавирусной инфекции являются важными участниками эпидемического процесса [15]. В ряде работ установлено, что вирусная нагрузка и вирусывыделение у полностью бессимптомных носителей новой коронавирусной инфекции сходны с таковыми у пациентов COVID-19, у которых есть симптомы заболевания [16]. Поэтому крайне важно оперативно выявлять таких индивидуумов методами ПЦР-диагностики [15, 17].

Одним из важнейших звеньев этиопатогенеза COVID-19 является дисфункция эндотелия [18]. К числу метаболических маркеров эндотелиальной дисфункции может быть отнесено повышение в плазме крови гиперметилованных форм аргинина – асимметричного диметиларгинина (АДМА) и симметричного диметиларгинина (СДМА). Значение этих соединений в организме состоит в их влиянии на продукцию оксида азота – основного фактора релаксации эндотелия и поддержания интимы сосудов и сосудистого эндотелия в функциональном состоянии. В нормальных, физиологических условиях синтезированный в эндотелиоцитах NO мигрирует в миоциты, располагающиеся в нижележащих слоях стенки сосуда, и активирует растворимую гуанилатциклазу, что повышает содержание циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), понижает концентрацию ионов кальция и расслабляет гладкомышечные клетки, обеспечивая кровоснабжение тканей [18].

Важным процессом, детерминирующим продукцию NO, является транспорт L-аргинина из кровотока в эндотелиальные клетки. В число причин снижения биодоступности оксида азота для клеток входит и повышенный уровень АДМА. При этом наблюдается снижение активности фермента диметиларгининдиметиламиногидролазы (ДДАГ), катализирующего разрушение АДМА. Кроме того, этот фермент чувствителен к окислительному стрессу. Состояние гипергликемии увеличивает продукцию активных форм кислорода и тем самым вносит вклад в снижение активности ДДАГ и накопление АДМА [19]. Взаимосвязь между окислительным стрессом и эндотелиальной дисфункцией отражается на уровне АДМА [20]. SARS-CoV-2, взаимодействуя с локализованными в эндотелии кровеносных сосудов рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2, вызывает развитие повреждение эндотелия, повышение проницаемости, нарушение микроциркуляции, формирование сосудистой тромбофилии и тромбообразование, дополнительное повреждение эндотелия. Устойчивая вазоконстрикция, опосредованная АДМА, приводит к потенцированному и быстрому развитию эндотелиальной дисфункции, что в дальнейшем опосредует развитие сердечно-сосудистых осложнений и появление новых жалоб в период после перенесенной инфекции COVID-19 [18]. Потенциально эндотелиальная дисфункция может развиваться и при носительстве SARS-CoV-2 при отсутствии симптоматики COVID-19, но в литературе данные исследования пока не отражены. Поэтому представляется важным изучить развитие данного патологического процесса в ситуации бессимптомного инфицирования пациента новой коронавирусной инфекцией.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести исследование ассоциации носительства SARS-CoV-2 с гиперметилованными формами аргинина (маркерами эндотелиальной дисфункции) – асимметричного диметиларгинина (АДМА) и симметричного диметиларгинина (СДМА).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проспективно обследованы 220 пациентов в возрасте от 30 до 50 лет (средний возраст – 42 года), которые на момент сдачи биологического материала и в течение двух недель после проведения ПЦР-анализа не имели клинически выраженных симптомов респираторного заболевания COVID-19. Из процедуры исследования исключались пациенты с нефропатиями и почечной недостаточностью, так как нарушение функции почек ассоциировано со значительным повышением уровня ADMA в плазме крови [21]. В критерии исключения входил также ряд сердечно-сосудистых заболеваний, для этиопатогенеза которых характерна эндотелиальная дисфункция: гипертоническая болезнь, атеросклероз (по данным УЗДГ), нарушения свертывания крови (по данным расширенной коагулограммы), острые нарушения мозгового кровообращения в анамнезе, а также диабет 2-го типа [22]. Из исследования исключались пациенты с гиперхолестеринемией и с индексом атерогенности выше верхней референтной границы 3,5. В группу обследуемых пациентов были включены 60 человек, которые имели в течение недели перед сдачей материала контакты с пациентами с COVID-19, диагноз у которых был подтвержден молекулярно-генетическим анализом (в возрасте от 32 до 48 лет, средний возраст 39 лет), 110 медицинских работников без подтвержденных контактов с пациентами с новой коронавирусной инфекцией (в возрасте от 30 до 49 лет, средний возраст 40 лет) и 50 контактных медицинских работников (в возрасте от 34 до 50 лет, средний возраст 43 года). Молекулярно-генетическая диагностика SARS-CoV-2 проводилась методами RT-PCR с ручным и автоматическим выделением вирусной РНК с использованием набора РеалБест РНК SARS-CoV-2 («Вектор-Бест», Россия) (заявленная чувствительность – 1000 копий/мл) с использованием автоматического выделения вирусной ДНК на платформе KingFisherFlex (Thermo Fisher Scientific) набором «РеалБестУниМаг». Положительный анализ на COVID-19 фиксировался в образцах, в которых уровень специфического сигнала по каналу FAM пересекал пороговую линию до 40-го цикла амплификации. При анализе использовался один положительный и один отрицательный контрольный образец.

У пациентов с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2 и отрицательным (группа контроля) методом ВЭЖХ-МС определялись уровни гиперметилированных форм аргинина АДМА и СДМА. ВЭЖХ-МС проводилась с использованием газового хроматографа с масс-спектрометром Agilent 6490 (Agilent Technologies, Германия) и колонки C18 Zorbax (Agilent Technologies, США). Венозную кровь на определение АДМА и СДМА у пациентов забирали утром натощак.

Получение и хранение проб сыворотки крови выполнялось в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкциях к наборам реактивов. После центрифугирования сыворотку крови замораживали и хранили при температуре –20 °С. Образцы с липемией и гемолизом в связи с вызванной ими вероятностью потенциальных неправильных результатов для анализа не использовались.

Полученные результаты анализировались в программе Statistica 10.0. Для описания данных использовались медианные значения показателей исследуемых метаболитов с указанием межквартильного интервала. Для оценки достоверности различий между данными, полученными в исследуемых группах, проводился однофакторный анализ. Также выполнялся корреляционный анализ, в ходе которого рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена.



■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены обобщенные результаты тестирования бессимптомных пациентов на SARS-CoV-2 методом RT-PCR с выделением нескольких подгрупп тестируемых.

В табл. 2 представлены медианы с указанием межквартильного интервала для уровней монометиларгинина (MMA), асимметричного диметиларгинина (ADMA), симметричного диметиларгинина (SDMA) в группе пациентов с выявленными методом ПЦР в реальном времени SARS-CoV-2 и в контрольной группе.

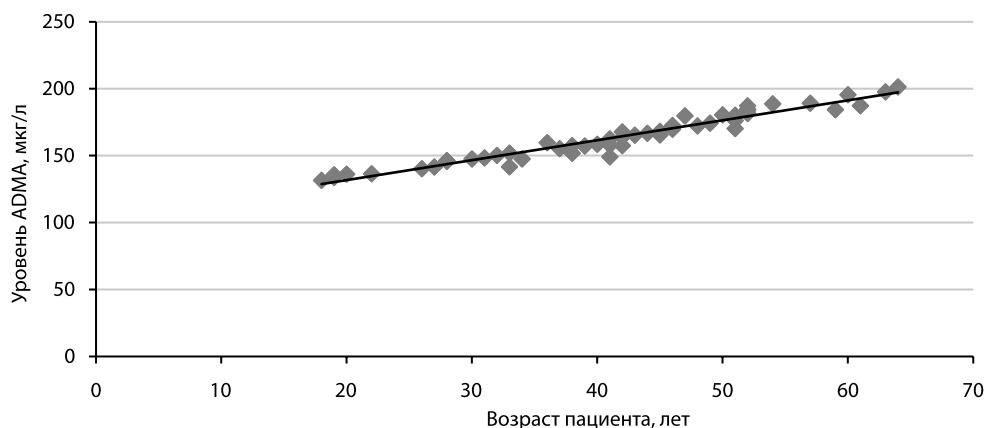
Выявлена корреляция уровня ADMA с возрастом пациентов – носителей SARS-CoV-2 ($r=0,970$) (см. рисунок). Для пациентов контрольной группы корреляции между возрастом и уровнем данного метаболита не обнаружено.

Таблица 1
Сводная таблица результатов молекулярно-генетического тестирования бессимптомных пациентов на инфекцию SARS-CoV-2
Table 1
Summary table of molecular genetic testing results for SARS-CoV-2 infection in asymptomatic patients

Группа пациентов (% от общего числа)	Общее число пациентов	Количество положи- тельных результатов	Доля положительных результатов, %
Всего (100%)	220	52	23,6
Контактные (54%)	60	29	56
Медицинские работники (50%)	110	6	5
Контактные медицинские работники (22%)	50	17	36

Таблица 2
Уровни монометиларгинина (MMA), асимметричного диметиларгинина (ADMA), симметричного диметиларгинина (SDMA) в группе бессимптомных носителей SARS-CoV-2 и в контрольной группе
Table 2
Monomethylarginine (MMA), asymmetric dimethylarginine (ADMA), and symmetric dimethylarginine (SDMA) levels in the group of SARS-CoV-2 asymptomatic carriers and in the control group

Метаболит	Медианное значение у носителей SARS-CoV-2, мкг/л (52 пациента)	Медианное значение пациентов контроль- ной группы, мкг/л (168 пациентов)	Референтные значения, мкг/л [18, 23, 24]
Монометиларгинин (MMA)	13,5 (10,2–25,3)	152,5 (95,2–301,2)	94,2–316,5
Асимметричный диметиларгинин (ADMA)	175,3 (131,5–201,3)	81,5 (75,4–119,7)	<100 – низкий уровень; 100–123 – промежуточный уровень; >123 – высокий уровень
Симметричный диметиларгинин (SDMA)	163,1 (140,6–175,2)	51,3 (31,2–70,5)	<73 – низкий уровень; 73–135 – промежуточный уровень; >135 – высокий уровень



Корреляционная зависимость уровня асимметричного диметиларгинина (ADMA) от возраста в группе носителей SARS-CoV-2 ($r=0,970$)
Correlation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) level with age in the SARS-CoV-2 carriers group ($r=0.970$)

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам данного исследования, в общей когорте пациентов без симптомов респираторного заболевания количество выявленных случаев инфекции SARS-CoV-2 составляет 23,6% (52 пациента). У 168 пациентов ПЦР-анализ на SARS-CoV-2 имеет отрицательный результат. В составе общей популяции на порядок выше величина инфицирования среди лиц, которые находились в контакте с заболевшими COVID-19 (56%). Среди медицинских работников уровень носительства SARS-CoV-2 составил всего 5%, у контактных же медицинских работников уровень носительства SARS-CoV-2 был 36%, что ниже процента носительства у контактных пациентов немедицинских специальностей. Этот результат может быть объяснен тем, что медицинские работники, которые потенциально контактируют с инфицированными COVID-19, лучше соблюдают противоэпидемический режим, контроль за которым в медицинских учреждениях осуществляется более строго, чем в общей популяции.

Следует отметить, что определенные виды специфического лабораторного тестирования новой коронавирусной инфекции должны применяться только для решения конкретных диагностических задач [14]. Важными параметрами являются специфичность и особенно чувствительность теста. Если принять за базис стадийность степени репликации SARS-CoV-2 в зависимости от стадии заболевания и тяжести его протекания, ПЦР-тесты с низкой чувствительностью подойдут для тестирования симптоматических пациентов, для выявления же бессимптомного носительства могут потребоваться более чувствительные тест-наборы для выявления SARS-CoV-2 методом ПЦР в реальном времени.

Результаты определения уровней гиперметилированных форм аргинина у носителей SARS-CoV-2 методом хромато-масс-спектрометрии показали достоверное увеличение ADMA (175,3 (131,5–201,3) мкг/л) и SDMA (163,1 (140,6–175,2) мкг/л) в сравнении с контрольной группой (81,5 (75,4–119,7) мкг/л и 51,3 (31,2–70,5) мкг/л).



соответственно, $p=0,03$), при этом значения данных показателей существенно превышали референтные значения ($100 \pm 1,1$ мкг/л и $75 \pm 0,8$ мкг/л соответственно), причем это увеличение коррелирует со снижением уровня монометиларгинина как предшественника в метаболической цепочке ADMA и SDMA. Зависимость же уровня ADMA у носителей SARS-CoV-2 от возраста пациента может говорить о том, что при носительстве новой коронавирусной инфекции с возрастом повышается вероятность эндотелиальной дисфункции, опосредованной SARS-CoV-2, что и отражается в уровнях данного метаболического маркера в плазме крови. Таким образом, можно полагать, что даже в случае носительства нового коронавируса в организме возникает эндотелиальная дисфункция, которая теоретически способна вызвать постковидные осложнения в виде нарушения микроциркуляции, развития тромбофилических состояний, что может приводить к сердечно-сосудистым нарушениям [18]. Поэтому даже легкие и бессимптомные случаи новой коронавирусной инфекции следует рассматривать (с точки зрения патогенетических процессов) как потенциально дающие постковидные осложнения, которые могут приводить к органным и системным дисфункциям. Разработка новых методов диагностики ковидных и постковидных воспалительных изменений позволит создать схему персонализированной терапии данного заболевания.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют прийти к заключению о том, что даже при носительстве SARS-CoV-2 выявляется эндотелиальная дисфункция, которая может быть установлена с использованием соответствующих метаболических маркеров. Таким образом, именно сосудистые эндотелиальные нарушения являются одними из ключевых в этиопатогенезе новой коронавирусной инфекции даже в случае бессимптомного инфицирования.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Paoli D, Pallotti F, Colangelo S, Basilio F, Mazzuti L, Turriziani O. et al. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab. *Journal of Endocrinological Investigation*. [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2020 Apr 23. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01261-1>
2. Ashour H.M., Elkhatab W.F., Rahman M.M., Elshabrawy H.A. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. *Pathogens* [Internet]. MDPI AG. 2020;9(3):186. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>
3. Center for Systems Science and Engineering (2020) *Coronavirus COVID-19 global cases*. Johns Hopkins University. Available at: <https://coronavirus.sjhu.edu/map.html> (accessed 3 Apr 2020)
4. Cascella M., Rajnik M., Cuomo A., Dulebohn S.C., Di Napoli R. *Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19)*. StatPearls Publishing. 2020. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> (accessed 3 Apr 2020).
5. Chen Y., Guo Y., Pan Y., Zhao Z.J. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. Elsevier BV. 2020;525(1):135–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>
6. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [Internet]. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). 2020;25(3). doi: 10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045.
7. Xie C., Jiang L., Huang G., Pu H., Gong B., Lin H., et al. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. Elsevier BV. 2020;93:264–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.050>
8. Peng X., Xu X., Li Y., Cheng L., Zhou X., Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *International Journal of Oral Science* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC. 2020;12(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0075-9>
9. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2. *Annals of Internal Medicine* [Internet]. American College of Physicians. 2020 Apr 13. Available at: <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
10. Wang W., Xu Y., Gao R., Lu R., Han K., Wu G., et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* [Internet]. American Medical Association (AMA). 2020 Mar 11. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>

11. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Available at: www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html (accessed 27 March 2020).
12. Huang W.E., Lim B., Hsu C., Xiong D., Wu W., Yu Y., et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology* [Internet]. Wiley. 2020 Apr 25. Available at: <https://doi.org/10.37473/dac/10.1101/2020.05.07.20093542>
13. FIND. COVID-19 Diagnostics Resource Centre. Available at: www.finddx.org/covid-19 (accessed March 21 2020).
14. Perevesentsev O., Chlodnaya T., Burtsev D. Foreign experience in molecular genetic and immunological diagnostics of SARS-CoV-2 (review). *Laboratory Service*. 2021;10(4):47–54. Available at: <https://doi.org/10.17116/labs20211004147> (in Russian)
15. Lai C.-C., Liu Y.H., Wang C.-Y., Wang Y.-H., Hsueh S.-C., Yen M.-Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [Internet]. Elsevier BV. 2020 Mar. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
16. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine* [Internet]. Massachusetts Medical Society. 2020;382(12):1177–9. Available at: <https://doi.org/10.3410/f.737402166.793571513>
17. Lippi G., Sanchis-Gomar F., Henry B.M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): the portrait of a perfect storm. *Annals of Translational Medicine* [Internet]. AME Publishing Company; 2020;8(7):497–497. Available at: <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.157>
18. Kukes I., Salmasi J., Ternovoy K., Kazimirskii A., Obodzinskaya T., Lim V., Glagovskiy P., Mamedov I., Poryadin G., Savicheva A., Kukes E., Ptitsyn M., Andreev A. Prerequisites for the creation of an atlas of postcovid inflammation as a way of personalized pharmacotherapy, as well as predicting and preventing organ and systemic dysfunctions. *Medical Council*. 2021;12:72–88. Available at: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-12-72-88> (in Russian)
19. Abbasi F., Asagmi T., Cooke J.P., Lamendola C., McLaughlin T., Reaven G.M., Stuehlinger M., Tsao P.S. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2001;88(10):1201–3. doi: 10.1016/s0002-9149(01)02063-x.
20. Riccioni G., D'Orazio N., Speranza L., Di Ilio E., Glade M., Bucciarelli V., Scotti L., Martini F., Pennelli A., Bucciarelli T. Carotenoids and asymptomatic carotid atherosclerosis. *J BiolRegulHomeostAgents*. 2010;24(4):447–52.
21. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:73–81.
22. Rodionov R., Blokhin I., Galagudza M., Shlyakhto E., Lentz S. The emerging role of asymmetric dimethylarginine in cardiovascular disease. *Arterial Hypertension*. 2008;14(4):306–314. Available at: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2008-14-4-306-314> (in Russian)
23. Jacobi J., Tsao P.S. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation limits? A systematic review. *Am J Nephrol*. 2008;28:224–237.
24. Hov G.G., Sagen E., Bigonah A., Asberg A. Health-associated reference values for arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) measured with high-performance liquid chromatography. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(8):868–76. doi: 10.1080/00365510701429836.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.2.002>



Chmagh A.A.¹✉, Salman B.D.², Abdulridha L.A.³

¹ Southern Technical University, Basrah, Iraq

² Basrah Health Directorate, Basrah, Iraq

³ Almaaql University, Basrah, Iraq

The Comparison of Antibody Responses to Natural COVID-19 Infection and Vaccination

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Chmagh A.A. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft; Salman B.D. – investigation, resources, data curation, writing – original draft; Abdulridha L.A. – conceptualization, formal analysis, investigation, resources.

Ethics statement. This study was approved by Department of Medical Laboratory Techniques, College of Health and Medical Technology, Southern Technical University (No. 7/27/1225 in 7/10/2021; and No. 7/27/1368 in 1/11/2021) and assurance by College of Health and Medical Technology, Southern Technical University (No. 7/27/607 in 11/4/2023). The study takes place at Al-Sadder Teaching Hospital.

Ethical committee: Department of Medical Laboratory Techniques, Health and Medical Technical College, Southern Technical University.

The approval number: 7/27/1225 (assurance 7/27/607).

Informed consent. All participants signature written consent form when included in this study.

The article is published in the author's edition.

Submitted: 06.09.2023

Accepted: 05.02.2024

Contacts: aala.abdulzahra@stu.edu.iq

Abstract

Introduction. Antibody responses are an important part of the immunity after SARS-CoV-2 vaccination.

Purpose. To investigate antibody responses and associates of protection after vaccination with the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1, BioNTech BNT162b2, and Sinopharm vaccines.

Materials and methods. Blood samples (2 ml) were collected from 122 participants and the serum was obtained. All the immunological and enzymatic reactions were done using the mini VIDAS device.

Results. In 61 participants, the BioNTech BNT162b2 vaccine was found to produce higher antibody levels compared with the levels produced by the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 and Sinopharm vaccines. Females had higher antibody levels following vaccination. Prior infection substantially increased antibody levels in the vaccinated group.

Conclusion. The stated increase in the number of antibodies detected in the blood serum was accompanied by an increase in the body's immune defence against infection after vaccination.

Keywords: vaccination, comparative evolution, antigen processing, retroviral, COVID-19

Чмаг А.А.¹✉, Салман Б.Д.², Абдулрида Л.А.³

¹ Южный технический университет, Басра, Ирак

² Управление здравоохранения Басры, Басра, Ирак

³ Университет Альмаакаль, Басра, Ирак

Сравнение состояний гуморального иммунного ответа на естественную инфекцию COVID-19 и проведение «противоковидной» вакцинации

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Чмаг А.А. – концепция, методология, проведение исследования, ресурсы, обработка данных, анализ полученных результатов, написание исходного текста статьи, программное обеспечение; Салман Б.Д. – проведение исследования, ресурсы, обработка данных, написание исходного текста статьи; Абдулрида Л.А. – концепция, анализ полученных результатов, проведение исследования, ресурсы.

Этическое заявление. Настоящее исследование одобрено кафедрой медицинской лабораторной техники Колледжа здравоохранения и медицинских технологий Южного технического университета (№ 7/27/1225 от 10.07.2021 и № 7/27/1368 от 11.01.2021), а также заверено Колледжем здравоохранения и медицинских технологий Южного технического университета (№ 7/27/607 от 4.11.2023). Исследование проходит в клинической больнице Аль-Саддер.

Этический комитет: кафедра медицинской лабораторной техники Колледжа здравоохранения и медицинских технологий Южного технического университета (№ 7/27/1225 (заверение 7/27/607)).

Информированное согласие. Все участники подписывают информированное согласие при включении в это исследование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 06.09.2023

Принята: 05.02.2024

Контакты: aala.abdulzahra@stu.edu.iq

Резюме

Введение. Гуморальный иммунный ответ является важной составляющей формирования иммунитета после вакцинации против SARS-CoV-2.

Цель. Исследовать состояние иммунного ответа и защитные свойства антител после применения вакцин Оксфорд/АстраЗенека ChAdOx1, БиоНтек BNT162b2 и Синофарм.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны образцы крови (по 2 мл) 122 испытуемых с последующим получением сыворотки. Все иммунологические и ферментативные реакции проводили с использованием прибора mini VIDAS.

Результаты. У 61 испытуемого после применения вакцины БиоНтек BNT162b2 уровень антител превышал уровень антител после применения вакцин Оксфорд/АстраЗенека ChAdOx1 и Синофарм. У женщин уровень антител после вакцинации был выше, чем у мужчин. Ранее перенесенная инфекция вызывала значительное повышение уровня антител в группе вакцинированных.

Закключение. Констатированное увеличение количества выявленных в сыворотке крови антител сопровождалось усилением иммунной защиты организма от инфекции после проведенной вакцинации.

Ключевые слова: вакцинация, сравнительная эволюция, процессирование антигена, ретровирусный, COVID-19



■ INTRODUCTION

At the end of 2019, a series of pneumonia cases with an unknown causative agent emerged in Wuhan (Hubei, China). In January 2020, analysis of samples from the lower respiratory tract revealed the presence of a novel virus. A few weeks later, deep sequencing analysis identified severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as the cause for the observed viral pneumonia cases. In a preliminary report, complete viral genome analysis detected that the virus was more distant from SARS coronavirus [1]. Subsequently, in February 2020, the World Health Organization (WHO) termed the disease triggered by SARS-CoV-2 as COVID-19 [2]. By March 2020, the WHO announced the pandemic status of COVID-19 when the number of countries involved was increased with more cases and higher death rates [2].

Coronaviruses are enveloped single-stranded ribonucleic acid viruses known for their solar corona-like shape due to the presence of surface spikes [3]. Coronaviruses have four major structural proteins encoded by the coronavirus genome; these consist of spike protein (S), envelope protein (E), matrix protein (M), and unexposed nucleocapsid protein (N). Among them, spike protein (S) is a key protein that interacts with angiotensin-converting enzyme 2 receptors and mediates subsequent fusion between the envelope and the host cell membrane to facilitate viral entry into host cells [4, 5].

Vaccination against SARS-CoV-2 is an important strategy to change the course of the COVID-19 pandemic [6]. Given its role in mediating viral entry, the coronavirus S protein is the main target of neutralizing antibodies and has been the focus of therapeutic and vaccine design [5].

The global response to reduce the spread of COVID-19 pandemic resulted huge health, economic and social consequences. Based on the urgent need to respond to the calamity, clinical trials and epidemiological studies have been started, and due to the presence of different types of vaccines and their distinctive characteristics to prompt specific immunity, in this study, we aimed to investigate antibody responses and associates of protection after vaccination with the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1, BioNTech BNT162b2, and Sinopharm vaccines.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To investigate antibody responses and associates of protection after vaccination with the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1, BioNTech BNT162b2, and Sinopharm vaccines.

■ MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Blood samples (2 ml) were collected from 122 participants (74 males and 48 females). Overall, 46 males received SARS-CoV-2 vaccines, whereas only 15 females received SARS-CoV-2 vaccines and blood samples of vaccinated peoples were collected 4 weeks after the second dose. Of the 61 participants who received SARS-CoV-2 vaccines, 46 participants did not have prior infection, and 15 participants had prior infection. The samples were collected from 11st October 2021 to 11st December 2021, and the serum was obtained for antibody level measurement.

Inclusion criteria

- Patients without chronic diseases.
- Patients received with two doses of vaccines.

- Blood samples were collected 3–6 months after the second dose.
- Comfortable for the study.

Exclusion criteria

- Patients have chronic illness.
- Pregnancy.
- Patients with cancer.
- Unvaccinated subjects.
- Patients received one dose of vaccine only.
- Blood samples below three months and/or more than six months.
- Loss of follow-up patients.

The mini VIDAS device

The mini VIDAS device is one of the most advanced devices for viral analysis, characterized by accurate results and speed of performance. Although, there are other more advanced devices, the mini VIDAS device (bioMérieux S.A., France, Cat. No.: C130-3567L) and VIDAS® SARS-COV-2 IgG (9COG, bioMérieux S.A., France, Cat. No.: 124472) had been used extensively.

The basis of this device is primarily established on the interplay between two components: the coated SPR® receptacle. Including antigens or antibodies, and the Strip, which made up of a chain of wells containing the correct amount of reagent necessary for the test. In addition, all reactions happen in two key phases within the SPR: enzymatic reaction and immunological reaction.

The whole operation is totally automated from incubation to washing and the ultimate reading. The whole operation is totally automated, from incubation, to washing and final reading. The time of incubation and washing cycles number are improved to make sure of their high performance using two-step sandwich enzyme immunoassay method with a final fluorescence detection. The amount of samples needed 100µL of serum or plasma. The number of replicates 2 (can be repeat each 27 minutes). The interpretation of results according to (i =index) are if $i < 1$ negative (no detection of IgM/ IgG anti SARS-CoV-2) or if $i \geq 1$ positive (detection of IgM/ IgG anti SARS-CoV-2).

Action steps:

1 – The serum is placed in a tape called a strip. This strip contains 10 holes, which are as follows:

- 1 = sample well;
- 2, 3, 4, 5 = empty wells;
- 6 = conjugate well;
- 7, 8, 9 = wash buffer;
- 10 = substrate.

The second component, which is a small conical tube and it acts as a straw, that is called a SPR.

2 – The SPR includes the anti-antibody, which sucked the serum in the first hole. There is a reaction of the antigen in the serum with the antibody in hole 6, which is later on connects with the enzyme.

3 – Of course all the particles are not interacted. The washing solution from one of the holes (7, 8, 9) is absorbed by the SPR. The washing solution returned to one of the



empty holes (2, 3, 4, 5), so that the antigen and antibody attached to the SPR are kept. This process is repeated many times.

4 – A fluorinated substance is found in the last hole (Fluorescence substrate), which is developed.

5 – SPR components are interacted with the fluorinated substance. The substrate, which linked enzyme is only remained in the measuring cell and flash lamp is lit.

According to the phosphorescent light theory, these particles take 370J and emit 450J from energy, which is recorded by the device in the form of the results for analyzes, and here the analysis ends (www.biomerieux-diagnostics.com; <https://5.imimg.com/data5/RW/LW/MQ/SELLER-4682066/biomeriux-minividas-blue-immunossay-analyzer.pdf>).

Statistical analysis

Statistical analysis of the data done by used Statistical Package for the Social Sciences V24. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All experimental data were expressed as mean± standard deviation (SD). Results were analysed by Chi-square test to compared between groups, Mann – Whitney U test to analysed relation between antibody levels and vaccine types, and Kruskal – Wallis test to compared between antibody levels and other variables. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 122 individuals were enrolled in this study. The majority of the participants were males (60.7%), and 46 of them (75.4%) received SARS-CoV-2 vaccines. On the other hand, 48 (39.3%) of the participants were females, and 15 of them (24.6%) received SARS-CoV-2 vaccines. Overall, 61 participants received SARS-CoV-2 vaccines; among them, there were 46 participants without prior infection (28.06%) and 15 participants with prior infection (9.15%). The SARS-CoV-2-specific IgG response was significantly higher in vaccinated individuals than in unvaccinated individuals (27.34 ± 17.97 and 18.05 ± 15.78 , respectively, $p = 0.006$) (Table 1).

Of the 61 participants, 7 of them (11.47%) received the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 vaccine, 17 of them (27.86%) received the Sinopharm vaccine, and 37 of them (60.65%) received the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. Participants who received the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine had a higher antibody level ($38.41 \mu\text{g/ml}$ ($34.60\text{--}50.69$)) compared with the levels of those who received the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 and Sinopharm vaccines ($38.20 \mu\text{g/ml}$ ($6.99\text{--}52.57$) and $4.02 \mu\text{g/ml}$ ($0.02\text{--}46.23$),

Table 1
Gender distribution among the vaccinated and unvaccinated groups

		Vaccination status			p value
		Vaccinated	Unvaccinated	Total	
		No. (%)			
Sex	Male	46 (75.40)	28 (45.90)	74 (60.65)	0.001
	Female	15 (24.60)	33 (54.10)	48 (39.35)	
IgG response ($\mu\text{g/ml}$) (Mean±SD)		27.34 ± 17.97	18.05 ± 15.78	–	0.006

Table 2
Antibody levels (µg/ml) in the vaccinated group according to the type of vaccine

Category		Antibody level		
		Mean±SD	Median (Min–Max)	p value
Type of vaccine	Oxford/AstraZeneca ChAdOx1	34.50±14.65	38.20 (6.99–52.57)	0.643
	Sinopharm	8.89±11.46	4.02 (0.02–46.23)	
	Pfizer-BioNTech BNT162b2	40.53±7.16	38.41 (34.60–50.69)	

Table 3
Antibody levels (µg/ml) in the vaccinated male and female groups according to the type of vaccine

Sex	Category	Type of vaccine			p value
		Sinopharm	Pfizer	AstraZeneca	
Male	Mean±SD	9.72±11.93	33.82±15.08	21.56±16.97	0.024
	Median (Min–Max)	6.54 (0.02–46.23)	37.13 (6.99–52.27)	16.00 (2.48–63.33)	
Female	Mean±SD	2.28±0.40	36.78±13.69	40.53±7.16	
	Median (Min–Max)	2.28 (2.00–2.57)	42.75 (14.61–52.57)	38.41 (34.60–50.69)	

Table 4
Antibody levels (µg/ml) in the vaccinated group according to prior infection status

Vaccinated group	Mean±SD	Median (Min–Max)	p value
Without prior infection	25.43±18.13	23.74 (0.02–52.27)	0.16
Prior infection	33.18±16.68	36.60 (2.00–52.57)	

respectively) (Table 2). Although not statistically significant, the antibody level was higher among participants who received the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine than among those who received the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 vaccine (40.53±7.16 vs. 34.50±14.65, respectively, p=0.643).

In comparison with males, females had statistically significant elevated IgG levels for the Pfizer-BioNTech BNT162b2 and Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 vaccines (36.78±13.69 and 40.53±7.16, respectively, p=0.024) (Table 3). Prior infection significantly increased the antibody level of the vaccinated group (Table 4).

■ DISCUSSION

Understanding the kinetics of the post-vaccine antibody response and vaccine-associated characteristics that determine the variability of this response is crucial for evaluating the effect of SARS-CoV-2 vaccines on patients [7].

A typical vaccination course against SARS-CoV-2 involves the delivery of a vaccine in two dosages. When the vaccines were tested for the first time, it was found that vaccination with a single dosage elicited a weak immune response. Therefore, it is necessary to deliver a second dosage for a strong antibody response. In phase one clinical trial of the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine, both dosages of the vaccine were highly effective in preventing infection following administration [8]. Furthermore, the Pfizer-BioNTech mRNA vaccine (BNT162b2) was discovered to be highly effective against COVID-19 patients who develop symptoms with an efficacy rate of 94% in a randomised clinical trial [9]. Consistent with our findings, Wei et al. [3] reported that those receiving



the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine had significantly higher antibody levels compared with the levels of those receiving the Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 vaccine [10]. Females had elevated IgG levels for both vaccines, consistent with commonly described improved immune responses in females [10–12]. The antibody response after vaccination differed significantly according to prior infection condition. Prior infection was accompanied with a substantially elevated antibody level for both BioNTech BNT162b2 and Oxford/AstraZeneca ChAdOx1 vaccination. This is in agreement with studies involving healthcare workers showing that prior SARS-CoV-2 infection leads to higher antibody levels after the second BioNTech BNT162b2 vaccines [13, 14]. Vicenti et al. [15] similarly stated that a single dosage of the BioNTech BNT162b2 vaccine prompted post-vaccination antibody levels that were equal to or higher than the levels of those obtained two dosages who were without prior infection [14].

■ CONCLUSION

The stated increase in the number of antibodies detected in the blood serum is accompanied by an elevation in the body's immune defence against infection after vaccination. The main limitation of this study was the inadequate sample size, which could be observed as insufficient to state that prior infection may contribute to a high antibody level. Nevertheless, there is still a possibility that prior infection with SARS-CoV-2 may boost antibody levels even at the first dose of the BioNTech BNT162b2 vaccine.

■ REFERENCES

1. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
2. Gennaro F Di, Pizzol D, Marotta C, et al. Fasting as a Way to Boost Your Immune System, Universitas Gadjah Mada. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(2690):1–11. <https://www.ugm.ac.id/en/news/19336-fasting-as-a-way-to-boost-your-immune-system>
3. Wei Q, Wang Y, Ma J, et al. Description of the First Strain of 2019-nCoV, C-Tan-nCoV Wuhan Strain – National Pathogen Resource Center, China, 2020. *China CDC Wkly*. 2020;2(6):81–82. doi: 10.46234/ccdcw2020.023
4. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*. 2016;531(7592):118–121. doi: 10.1038/nature17200
5. Salvatori G, Luberto L, Maffei M, et al. SARS-CoV-2 spike protein: An optimal immunological target for vaccines. *J Transl Med*. 2020;18(1):1–3. doi: 10.1186/s12967-020-02392-y
6. Antonelli M, Penfold RS, Merino J, et al. Risk factors and disease profile of post-vaccination SARS-CoV-2 infection in UK users of the COVID Symptom Study app: a prospective, community-based, nested, case-control study. *Lancet Infect Dis*. Published online 2021:1–13. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00460-6
7. El-Ghitany EM, Hashish MH, Farag S, Omran EA, Farghaly AG, El-Moez Azzam NFA. Determinants of the Development of SARS-CoV-2 Anti-Spike Immune-Response after Vaccination among Healthcare Workers in Egypt. *Vaccines*. 2022;10(2):1–10. doi: 10.3390/vaccines10020174
8. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based COVID-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med*. 2020;383(25):2439–2450. doi: 10.1056/nejmoa2027906
9. Dundar B, Karahangil K, Nur H, Topsakal H. Efficacy of antibody response following the vaccination of SARS-CoV-2 infected and noninfected healthcare workers by two – dose inactive vaccine against COVID-19. 2022;(February):2431–2437. doi: 10.1002/jmv.27649
10. Wei J, Pouwels KB, Stoesser N, Matthews PC, Diamond I, Studley R, Rourke E, Cook D, Bell JI, Newton JN, Farrar J, Howarth A, Marsden BD, Hoosdally S, Jones EY, Stuart DI, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, Eyre DW; COVID-19 Infection Survey team. Antibody responses and correlates of protection in the general population after two doses of the ChAdOx1 or BNT162b2 vaccines. *Nat Med*. 2022 May;28(5):1072–1082. doi: 10.1038/s41591-022-01721-6. Epub 2022 Feb 14.
11. Amodio E, Capra G, Casuccio A, et al. Antibodies responses to sars-cov-2 in a large cohort of vaccinated subjects and seropositive patients. *Vaccines*. 2021;9(7):714. doi: 10.3390/vaccines9070714
12. Ward H, Whitaker M, Tang SN, Atchison C, Darzi A, Donnelly CA, Diggle PJ, Ashby D, Riley S, Barclay WS, Elliott P, Cooke G. Vaccine uptake and SARS-CoV-2 antibody prevalence among 207,337 adults during May 2021 in England: REACT-2 study. Preprint. medRxiv. 2021.
13. Urbanowicz RA, Tsoleridis T, Jackson HJ, et al. Two doses of the SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine enhance antibody responses to variants in individuals with prior SARS-CoV-2 infection. 2021;1(September):1–10.
14. Buonfrate D, Piubelli C, Gobbi F, Martini D, Bertoli G, Ursini T, Moro L, Ronzoni N, Angheben A, Rodari P, Cardellino C, Tamarozzi F, Tais S, Rizzi E, Degani M, Deiana M, Prato M, Silva R, Bisoffi Z. Antibody response induced by the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in a cohort of healthcare workers, with or without prior SARS-CoV-2 infection: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Dec;27(12):1845–1850. doi: 10.1016/j.cmi.2021.07.024. Epub 2021 Jul 28.
15. Vicenti I, Gatti F, Scaggiante R, Boccuto A, Zago D, Basso M. The second dose of the BNT162b2 mRNA vaccine does not boost SARS-CoV-2 neutralizing antibody response in previously infected subjects. *Infection*. 2022;50(2):541–543. doi: 10.1007/s15010-021-01680-z



Голюченко О.А.¹✉, Иванова Т.А.², Жильцов И.В.¹, Скребло Е.И.¹

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

² Шумилинская центральная районная больница, Шумилино, Беларусь

Показатели липидного спектра сыворотки крови пациентов с COVID-19 как вероятные биомаркеры неблагоприятного исхода развития заболевания

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Голюченко О.А. – концепция и дизайн исследования, анализ результатов, статистическая обработка данных, интерпретация результатов, написание текста; Иванова Т.А. – сбор и обработка данных, анализ результатов; Жильцов И.В. – анализ результатов, написание и редактирование текста; Скребло Е.И. – сбор и обработка данных, редактирование текста.

Подана: 14.12.2023

Принята: 08.04.2024

Контакты: goluchenkoolga@gmail.com

Резюме

Введение. В настоящее время продолжают исследования, направленные на поиск лабораторных биомаркеров, способных помочь в оценке прогрессирования COVID-19 и тяжести состояния пациентов. Имеющаяся взаимосвязь функционирования иммунной, эндокринной и липидтранспортной систем позволяет предположить роль оценки изменения параметров липидного метаболизма в прогнозировании исходов заболевания.

Цель. Анализ показателей липидного обмена во взаимосвязи с тяжестью заболевания и изменением других лабораторных показателей для определения возможных дополнительных факторов прогноза неблагоприятного течения COVID-19.

Материалы и методы. Проводился ретроспективный анализ медицинской документации 100 пациентов с COVID-19, имевших различные исходы заболевания, с изучением биохимических показателей (С-реактивный белок, ферритин, активность лактатдегидрогеназы, липидный профиль), результатов качественной ПЦР для выявления вирусной РНК, иммунохроматографического определения антител классов IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2.

Результаты. В результате анализа полученных данных установлены изменения показателей липидного метаболизма (снижение уровня общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности с тенденцией к повышению уровня холестерина липопротеинов очень низкой плотности и триглицеридов) во взаимосвязи с повышением уровня лактатдегидрогеназы у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания.

Заключение. Снижение уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности в сочетании с повышением уровня лактатдегидрогеназы можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза у пациентов с COVID-19. С учетом влияния глюкокортикоидных гормонов, применяющихся в лечении пневмонии, ассоциированной с COVID-19, на уровни ряда белков острой фазы



воспаления необходимо изучить возможность использования результатов оценки динамики показателей липидного профиля сыворотки крови у пациентов с пневмониями для прогнозирования ухудшения состояния пациента и исхода заболевания.

Ключевые слова: COVID-19, показатели липидного обмена, воспаление, исход заболевания, биомаркеры

Volha A. Haliuchenka¹✉, Tatsyana A. Ivanova², Ivan V. Zhyltsou¹, Alena I. Screblo¹

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

² Shumilino Central District Hospital, Shumilino, Belarus

Blood Serum Lipid Spectrum Parameters in COVID-19 Patients as Probable Biomarkers for Unfavorable Disease Outcome

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Volha A. Haliuchenka – research concept and design, results analyzing, statistical data processing, results interpreting, text writing; Tatsyana A. Ivanova – data collecting and processing, results analyzing; Ivan V. Zhyltsou – results analyzing, text writing and editing; Alena I. Screblo – data collecting and processing, text editing.

Submitted: 14.12.2023

Accepted: 08.04.2024

Contacts: goluchenkoolga@gmail.com

Abstract

Introduction. Currently, studies aimed at searching for laboratory biomarkers to help in assessing COVID-19 progression and the severities of the patients' condition are ongoing. The existing relationship between the immune, endocrine, and lipid transport systems functioning suggests the role of assessing lipid metabolism parameter changes in predicting disease outcomes.

Purpose. To analyze lipid metabolism parameters in correlation with disease severity and changes in other laboratory parameters to determine probable additional prognostic factors for COVID-19 unfavorable course.

Materials and methods. We conducted a retrospective analysis of medical records of 100 patients with COVID-19 with different disease outcomes, including biochemical findings (C-reactive protein, ferritin, lactate dehydrogenase activity, and lipid profile), qualitative PCR for viral RNA detection results, and immunochromatographic tests for IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2 virus detection results.

Results. As a result of analysis of the data obtained, changes in lipid metabolism parameters (decrease in the level of total cholesterol and low- and high-density lipoprotein cholesterol with a tendency to increase in very low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides) in correlation with increased level of lactate dehydrogenase in patients with unfavorable outcomes of the disease were established.

Conclusion. Decrease in total cholesterol and high- and low-density lipoprotein cholesterol levels in combination with an increase in lactate dehydrogenase levels can be considered as an unfavorable prognostic factor in patients with COVID-19. Taking into account effects of glucocorticoid hormones used in the treatment of COVID-19-

associated pneumonia on the levels of several proteins in acute phase of inflammation, it seems important to study the possibility of using results of serum lipid profile evaluation in patients with pneumonia to predict the deterioration of a patient's condition and the disease outcome.

Keywords: COVID-19, lipid metabolism parameters, inflammation, disease outcome, biomarkers

■ ВВЕДЕНИЕ

Пациенты с COVID-19 (аббревиатура от англ. COrona Virus Disease 2019) имеют потенциальные риски развития тяжелого течения респираторной инфекции, в том числе пневмонии. Коронавирус SARS-CoV-2 способен вызвать системное поражение организма человека с вовлечением широкого спектра органов и тканей, характеризующееся чрезвычайно вариабельным клиническим течением заболевания. Чаще всего заболевание протекает в форме острой респираторной вирусной инфекции легкого течения, но возможно развитие тяжелой формы, в том числе вирусной пневмонии с острым респираторным дистресс-синдромом или дыхательной недостаточностью с риском фатального исхода, а также тяжелой системной воспалительной реакции и бактериальных осложнений. «Дикий» штамм и вирусы, относящиеся к бета- и дельта-штаммам, вызывали большее количество тяжелых форм по сравнению со штаммами, циркулировавшими позже, например, омикроном. Септический шок и вторичные бактериальные инфекции являются частыми осложнениями у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии [1].

В настоящее время продолжаются исследования, направленные на поиск параметров (в том числе лабораторных), способных помочь не только в диагностике заболевания, но и в оценке его прогрессирования и тяжести состояния пациентов. Важное и активно разрабатываемое направление связано с изучением роли различных биологических маркеров в оценке тяжести и прогнозировании вероятности неблагоприятного течения и исхода заболевания [2]. Данная информация важна не только для определения показаний к госпитализации пациентов или к их переводу в отделения реанимации и интенсивной терапии, но и для выработки лечебной тактики и оценки ее эффективности.

Ранее нами было констатировано, что значимыми факторами риска неблагоприятного исхода COVID-19 являются такие лабораторные признаки, как повышение содержания ферритина, С-реактивного белка (СРБ), нейтрофильных лейкоцитов в крови, а также падение количества лимфоцитов и моноцитов. Неблагоприятный исход COVID-19, вероятно, связан с нарушением регуляции иммунновоспалительного ответа, что подтверждается разнонаправленными сдвигами лабораторных показателей пациентов и особенностями корреляций этих показателей с исходами заболевания [3]. Вызывает интерес также изучение прогностической роли динамики показателей липидограммы во взаимосвязи с результатами других лабораторных тестов с учетом функции липопротеиновых комплексов, а также влияние воспаления на динамику их содержания в крови. Кроме того, лечение пациентов с тяжелыми формами COVID-19 предполагает назначение им интенсивной терапии, в том числе – иммуносупрессивной (глюкокортикоидные гормоны, тоцилизумаб и др.),



что может сказываться на результатах исследования острофазных белков (СРБ, ферритин) и приводить к недооценке тяжести состояния пациента. Таким образом, при выявлении новых дополнительных маркеров неблагоприятного прогноза течения коронавирусной инфекции возможно более раннее изменение тактики лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ показателей липидного спектра сыворотки крови во взаимосвязи с критериями оценки тяжести течения заболевания и изменением других лабораторных показателей для определения возможных дополнительных факторов прогноза неблагоприятного течения COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проводился ретроспективный анализ медицинской документации (амбулаторных карт, историй болезни пациентов) за период с апреля по декабрь 2020 года. Исследование проводилось на базе учреждения здравоохранения «Шумилинская центральная районная больница». Оценивались значения следующих показателей биохимического анализа крови: СРБ, ферритин, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС-ЛПОНП), триглицериды (ТГ). Исследование проводилось с использованием автоматического биохимического анализатора BioSystems BA 400, LedTechnology, Испания. Было выполнено выявление РНК вируса методом качественной ПЦР (с использованием ДНК-амплификатора Real-time BIORAD CFX96, Bio-Rad, США), проводилось определение антител классов IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 в образцах цельной крови пациентов методами иммунохроматографического анализа с использованием тест-системы «SARS-CoV-2 тест на антитела», производитель Beijing Lepu Medical Technology, КНР (показатели аналитической чувствительности и специфичности – 92,43% и 99,15% соответственно).

Всего в исследование было включено 100 пациентов в возрасте от 20 до 90 лет (59 [50; 70]) с COVID-19. Диагноз «COVID-19» подтверждался в соответствии с актуальными нормативными документами МЗ Республики Беларусь.

В выборку вошли 44 мужчины (44%) и 56 женщин (56%). Из них 76 пациентов имели COVID-ассоциированную интерстициальную пневмонию, 14 пациентов умерли, в том числе 9 – с рентгенологически подтвержденной интерстициальной пневмонией.

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 12. Использованы методы непараметрической статистики, описательной статистики. Числовые значения показателей выражены в виде медианы, первого и третьего квартилей.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов, умерших от COVID-19, показатели ОХС и ХС-ЛПВП были статистически значимо ниже по сравнению с таковыми выживших пациентов. Кроме того, отмечаются статистически значимые различия в уровнях ЛДГ. В то же время концентрации ферритина, СРБ, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП, ТГ в обеих группах статистически значимо не различались (табл. 1).

При проведении корреляционного анализа была выявлена статистически значимая обратная корреляция средней силы между уровнями ЛДГ и ХС-ЛПВП (коэффициент корреляции Спирмена $-0,55$, $p<0,05$), кроме того, описаны слабые, но статистически значимые обратные корреляции между смертью пациентов и уровнем ОХС (коэффициент корреляции Спирмена $-0,23$, $p<0,05$), концентрацией ХС-ЛПВП (коэффициент корреляции Спирмена $-0,3$, $p<0,05$), а также прямая корреляция между активностью ЛДГ и концентрацией ферритина сыворотки крови (коэффициент корреляции Спирмена $0,5$, $p<0,05$).

При оценке различных лабораторных показателей у пациентов с интерстициальной пневмонией, ассоциированной с COVID-19, были выявлены статистически значимые различия показателей ЛДГ, ОХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП у выживших и умерших пациентов. Кроме того, имела тенденция к повышению показателей ТГ и ХС-ЛПОНП у умерших пациентов (табл. 2).

В соответствии с литературными данными, уровень ЛДГ (внутриклеточного гликолитического фермента, который находится в клетках всех тканей организма) отражает тяжесть повреждения тканей вследствие воспалительного процесса и гипоксии. Так, показано, что выраженное повышение ЛДГ часто наблюдалось у пациентов с пневмонией при COVID-19 в ассоциации с повышением уровня СРБ и D-димера, а также снижением абсолютного содержания тромбоцитов и лимфоцитов в периферической крови [4]. Кроме того, ЛДГ предлагается использовать в качестве одного из показателей, используемых для мониторинга состояния пациента и эффективности терапии у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом и прогрессирующим синдромом активации макрофагов, а также как один из наиболее значимых прогностических биомаркеров у пациентов с COVID-19 [5].

Таблица 1
Показатели исследованных лабораторных тестов у умерших и выживших пациентов с COVID-19
Table 1
Laboratory testing findings in deceased and survived COVID-19 patients

Показатель	Умершие	Выжившие	p (M-W U test)
ЛДГ, ед/л	956 [669; 1177]	580 [431; 678]	0,004
ОХС, ммоль/л	3,58 [3,09; 4,41]	4,28 [3,64; 5,27]	0,005
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,62 [0,35; 1,15]	1,15 [0,88; 1,48]	0,006

Таблица 2
Некоторые лабораторные показатели умерших и выживших пациентов с пневмонией, ассоциированной с COVID-19
Table 2
Laboratory testing findings in deceased and survived patients with COVID-19-associated pneumonia

Показатель	Умершие	Выжившие	p (M-W U test)
ЛДГ, ед/л	1103 [728; 1758]	614 [414; 733]	0,005
ОХС, ммоль/л	3,63 [3,10; 4,18]	4,59 [3,73; 5,4]	0,009
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,35 [0,3; 0,37]	1,29 [0,89; 1,48]	0,006
ХС-ЛПНП, ммоль/л	1,51 [1,5; 1,85]	2,43 [1,78; 3,34]	0,045
ХС-ЛПОНП, ммоль/л	0,68 [0,65; 1,0]	0,5 [0,41; 0,66]	$>0,05$
ТГ, ммоль/л	1,5 [1,42; 2,37]	0,99 [0,83; 1,2]	$>0,05$



Корреляционный анализ выявил у пациентов с пневмонией прямую корреляцию средней силы между уровнями ЛДГ и ТГ (коэффициент корреляции Спирмена 0,5, $p < 0,05$), ЛДГ и ферритина (коэффициент корреляции Спирмена 0,5, $p < 0,05$), а также обратную корреляцию между активностью ЛДГ и концентрацией ХС-ЛПВП (коэффициент корреляции Спирмена $-0,51$, $p < 0,05$).

У умерших пациентов с пневмониями присутствует сильная обратная корреляция между активностью ЛДГ и концентрацией ХС-ЛПВП (коэффициент корреляции Спирмена $-0,79$, $p < 0,05$), что может указывать на возможную взаимосвязь уровня ХС-ЛПВП и выраженности повреждения тканей.

Полученные нами данные согласуются с рекомендациями Доценко Э.А. и соавт., в которых определены лабораторные показатели, влияющие на неблагоприятный исход тяжелых форм бактериальных инфекций. К ним отнесены: снижение уровня общего холестерина < 2 ммоль/л в сочетании с уровнем ХС-ЛПВП $< 0,5$ ммоль/л и/или уровнем ХС ЛПНП < 1 ммоль/л, а также снижение содержания Т-лимфоцитов CD3+ $\leq 56\%$, значительное снижение содержания Т-регуляторных клеток (CD4+ CD25hi CD127-) $\leq 0,6\%$, повышение процентного содержания субпопуляций В-лимфоцитов (CD19+) более чем в 1,5 раза от верхней границы нормы при снижении В1-клеток (CD19+ CD5+) $\leq 0,57\%$, увеличение доли истощенных Т-лимфоцитов более 8%. Наличие одного метаболического и одного иммунологического критериев позволяет сделать вывод о неблагоприятном прогнозе тяжелой формы бактериальной инфекции [6].

До сих пор взаимосвязь изменений показателей липидного метаболизма и течения COVID-19 остается неопределенной, несмотря на ряд исследований, посвященных этой проблеме.

Имеются исследования (проспективные наблюдательные, описания серии случаев), указывающие на снижение уровня ОХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, ТГ при вирусных инфекциях, в том числе COVID-19. При этом снижение ОХС и ХС-ЛПНП наблюдалось практически у всех пациентов, в то время как снижение уровня ХС-ЛПВП наблюдалось у тяжелых пациентов и коррелировало с неблагоприятным исходом [7]. Выявленные изменения могут быть связаны как с вовлечением печени в патологический процесс, так и с модификацией структуры и функции липопротеиновых комплексов в присутствии провоспалительных цитокинов. Другие авторы указывают на повышение уровня ХС-ЛПНП, в то время как содержание ХС-ЛПВП и ОХС обратно коррелировало со степенью тяжести COVID-19 [8].

Известно, что инфекционные процессы различной этиологии вызывают изменения липидного метаболизма, модифицирующие энергетические процессы, иммунный сигналинг и репарацию тканей [9]. Ряд авторов указывает на тесную взаимосвязь функционирования иммунной и липид-транспортной систем, причем имеется как влияние воспаления на структуру и функцию компонентов липид-транспортной системы, так и противоположное влияние липидного метаболизма на функционирование системы иммунитета [10–12].

Тенденция к повышению уровня триглицеридов и ХС-ЛПОНП у пациентов с неблагоприятным исходом пневмоний может быть обусловлена большей активностью у них воспалительного процесса. Известно, что при воспалении активируется продукция ЛПОНП и снижается активность их липолитической трансформации в ЛПНП [13].

Нами выявлены статистически значимо более низкие показатели ХС-ЛПВП у умерших пациентов с пневмониями (табл. 2). Известно, что ЛПВП способны связывать вирусы, бактериальные токсины, стабилизировать эндотелий. Системное воспаление вызывает снижение ЛПВП на 40–70%, у пациентов с сепсисом такие изменения ассоциированы с ухудшением прогноза и увеличением риска острого повреждения почек. Течение COVID-19 может быть ассоциировано с клиническими проявлениями системного воспалительного ответа, а также с клинико-лабораторными проявлениями сепсиса (дисрегуляция иммунного ответа, изменение спектра липидов сыворотки, эндотелиальная дисфункция, коагулопатия). ЛПВП способны модифицировать характер воспалительного ответа и повреждение тканей (в частности легочное и почечное повреждение) благодаря апопротеинам (М, АII и др.), ферментам (альфа-1-антитрипсин) и фосфолипидам (сфингозин-1-фосфат и др.), входящим в их состав. Кроме того, ЛПВП обладают рядом полезных свойств (антитромботическая активность, иммуномодулирующие, антиоксидантные свойства). Воспалительный процесс может изменять структуру, а следовательно, и функцию ЛПВП. Так, в условиях воспаления в ЛПВП накапливаются острофазные белки, такие как сывороточный амилоид А, составляя до 80% их протеинового состава, что модифицирует их противовоспалительные свойства [7].

Ряд исследований демонстрирует снижение уровня ЛПВП и АпоА1 на фоне тяжелых инфекций, в частности сепсиса. Это снижение коррелирует с тяжестью воспалительного ответа и прогнозом заболевания.

Механизм этого явления связан с увеличением потребления ЛПВП, снижением их синтеза в печени вследствие ее повреждения, а также с повышенным захватом посредством сквенджер-рецепторов SR-BI. Более того, эндотелиальная дисфункция может усиливать потерю ЛПВП из крови. Другие механизмы ассоциированы с ремоделированием протеома и липидома ЛПВП. При сепсисе состав ЛПВП меняется: увеличивается содержание триглицеридов и снижается – фосфолипидов вследствие активации секреторной фосфолипазы А2 и повышения уровня лизофосфатидилхолина [7].

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов, умерших от COVID-19, отмечены статистически значимо более низкие значения ОХС и ХС-ЛПВП на фоне более высоких значений ЛДГ.
2. У пациентов, умерших от пневмонии, ассоциированной с COVID-19, отмечены статистически значимо более низкие значения ОХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП на фоне более высоких значений ЛДГ, а также тенденция к повышению уровней ХС-ЛПОНП и ТГ.
3. Выявлены статистически значимые корреляции концентрации ХС-ЛПВП и активности ЛДГ, в том числе у пациентов, умерших от пневмонии, связанной с COVID-19.
4. Снижение показателей содержания ОХС, ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза у пациентов с COVID-19.
5. С учетом влияния глюкокортикоидных гормонов, применяющихся в лечении пневмонии, ассоциированной с COVID-19, на уровни ряда белков острой фазы воспаления представляется целесообразным изучить возможность использования оценки динамики концентрации ОХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП у пациентов с пневмониями для прогнозирования ухудшения состояния пациента



и неблагоприятного исхода заболевания. Это позволит заранее выделять пациентов группы риска и превентивно интенсифицировать оказание им медицинской помощи.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Marini J.J., Gattinoni L. Management of COVID-19 Respiratory Distress. *JAMA*. 2020;323(22):2329–2330. doi: 10.1001/jama.2020.6825.
2. Malkova A., Kudlay D., Kudryavtsev I. et al. Immunogenetic Predictors of Severe COVID-19. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(3):211. Published 2021 Mar 3. doi: 10.3390/vaccines9030211.
3. Haliuchenka V., Screblo Ye., Zhyltsou I. et al. Analysis of laboratory factors of adverse outcomes in patients with COVID-19. *Advances in medicine and medical sciences: collection of Belarusian state medical university Peer-reviewed annual collection of scientific papers*. 2022;12(1):277–281. (in Russian)
4. Yan L., Zhang H.-T., Xiao Y. et al. Prediction of criticality in patients with severe COVID-19 infection using three clinical features: a machine learning-based prognostic model with clinical data in Wuhan (Electronic resource). Available at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.27.20028027v2>. (accessed 04.06.2021).
5. Wynants L., Van Calster B., Collins G.S. et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of COVID-19: systematic review and critical appraisal. *BMJ*. 2020;369:m1328. doi: 10.1136/bmj.m1328.
6. Docenko E., Zaharova A., Fomina E. et al. *Method for predicting the unfavorable outcome of bacterial infections in patients with severe disease. Instructions for use*. Minsk. 2021. Reg. № 073-0621. (in Russian)
7. Stasi A., Franzin R., Fiorentino M. et al. Multifaced Roles of HDL in Sepsis and SARS-CoV-2 Infection: Renal Implications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5980. doi: 10.3390/ijms22115980.
8. Tang Y., Hu L., Liu Y. et al. Possible mechanisms of cholesterol elevation aggravating COVID-19. *Int J Med Sci*. 2021;18(15):3533–3543. doi: 10.7150/ijms.62021.
9. Khovidhunkit W., Kim M.S., Memon R.A. et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: Mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res*. 2004;45:1169–1196. doi: 10.1194/jlr.R300019-JLR200.
10. Lee W., Ahn J.H., Park H.H. et al. COVID-19-activated SREBP2 disturbs cholesterol biosynthesis and leads to cytokine storm. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):186. doi: 10.1038/s41392-020-00292-7.
11. Sohrabi Y., Reinecke H., Godfrey R. Altered Cholesterol and Lipid Synthesis Mediates Hyperinflammation in COVID-19. *Trends Endocrinol Metab*. 2021;32(3):132–134. doi: 10.1016/j.tem.2021.01.001. Epub 2021 Jan 8.
12. Golyuchenko O., Osochuk S. Some features of the endocrine, immune, and lipid transport systems of frequently ill children with acute respiratory infections. *Journal of Grodno State Medical University*. 2015;4(52):54–57. (in Russian)
13. Khovidhunkit W., Memon R.A., Feingold K.R. et al. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 3:462–72. doi: 10.1086/315611.



Астапов А.А.¹, Шилейко И.Д.¹, Гуркова А.В.²✉

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Клиническая и лабораторная диагностика малярии в условиях проявления завозной заболеваемости паразитозом в Республике Беларусь

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Астапов А.А. – концепция, написание текста; Шилейко И.Д. – написание текста, редактирование; Гуркова А.В. – написание текста, литературный обзор.

Подана: 21.09.2023

Принята: 19.04.2024

Контакты: anhen911@tut.by

Резюме

Малярия является одной из наиболее распространенных паразитарных болезней в мире, характеризуется тяжелым течением и имеет достаточно высокий показатель летальности. Республика Беларусь в настоящее время не входит в число эндемичных по малярии регионов. Однако, учитывая наличие на территории нашей страны источников инфекции (ежегодно регистрируются завозные случаи заболевания малярией), переносчиков малярийного плазмодия (комаров рода *Anopheles*), а также восприимчивого населения, можно говорить о существовании предпосылок для возникновения местных случаев заболевания малярией. В этой связи очевидна актуальность раннего выявления и своевременного лечения этого заболевания. Одной из важных составляющих деятельности, направленной на диагностику заболевания и предупреждение распространения малярии на территории Республики Беларусь, является лабораторная диагностика, состоящая в выявлении малярийных плазмодиев в препаратах крови методом световой микроскопии. В ходе проведения лабораторного исследования в обязательном порядке должна проводиться оценка уровня паразитемии, что является важным как для прогноза течения заболевания, так и эффективности проводимого лечения.

Ключевые слова: малярия, плазмодий, заболеваемость, лихорадка, анемия, диагностика, микроскопия



Anatoli A. Astapov¹, Irina D. Shileiko¹, Anna V. Gurkova²✉

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² City Children's Infectious Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Clinical and Laboratory Diagnosis of Malaria in the Context of Imported Parasitosis Incidence in the Republic of Belarus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Anatoli A. Astapov – concept, text writing; Irina D. Shileiko – text writing, editing; Anna V. Gurkova – text writing, literature review.

Submitted: 21.09.2023

Accepted: 19.04.2024

Contacts: anhen911@tut.by

Abstract

Malaria is one of the most widespread parasitic diseases in the world, and is characterized by a severe course and a quite high mortality rate. The Republic of Belarus is currently not considered one of the malaria endemic regions. However, taking into account the presence of sources of infection on the territory of our country (imported cases of malaria are recorded annually), carriers of malarial plasmodium (mosquitoes of the genus *Anopheles*), as well as a susceptible population, we can talk about the existence of prerequisites for local malaria cases emergence. In this regard, the relevance of early detection and timely treatment of this disease is obvious. One of the important components of activities aimed at preventing the spread of malaria on the territory of the Republic of Belarus is laboratory diagnostics, which consists of identifying malarial plasmodia in blood products using light microscopy. During laboratory testing, it is mandatory to assess the parasitemia level, which is important both for prognosis of the disease course and the effectiveness of the treatment.

Keywords: malaria, plasmodium, morbidity, fever, anemia, diagnostics, microscopy

■ ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологическая ситуация с заболеваемостью малярией в мире остается достаточно сложной. Особенно это касается стран Африки, Юго-Восточной Азии и Южной Америки. Ежегодно в мире малярией заболевает до 300 млн людей, из них умирает от 1,5 до 2 млн человек. Трудности в борьбе с этим заболеванием обусловлены развитием у малярийных плазмодиев резистентности к противомалярийным препаратам, а также высокой инфицированностью населения в эндемичных странах – до 90%. Именно поэтому Всемирная организация здравоохранения уделяет большое внимание этой проблеме: по инициативе ВОЗ 25 апреля объявлен Всемирным днем борьбы с малярией.

Вопросам диагностики, лечения и предупреждения распространения малярии уделяется большое внимание и в Республике Беларусь. Министерством здравоохранения утверждено постановление от 21.03.2013 № 23 «Об утверждении Санитарных

норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения малярии», которое является основным документом, регламентирующим комплекс мероприятий по предупреждению заноса и распространения малярии в Республике Беларусь [1].

Территория Республики Беларусь с давних времен была эндемичной по малярии, но в 50-е годы прошлого века ликвидировать это заболевание удалось на всей территории страны. В настоящее время заболеваемость малярией в Республике Беларусь носит спорадический характер и представлена завозными случаями. Тем не менее, в нашей стране продолжают оставаться условия для возникновения местных случаев малярии, поскольку на территории Беларуси распространены комары рода *Anopheles*, являющиеся переносчиком малярийного плазмодия. Например, в летнем периоде 2023 года была отмечена высокая популяция этих комаров, включающая 6 их подвидов. Кроме того, наличие завозных случаев малярии (а их в Республике Беларусь ежегодно регистрируется от 5 до 16) при наличии переносчика заболевания может привести к появлению местных случаев. Следует также учитывать и высокую восприимчивость местного населения к малярийному плазмодию. Одним из факторов возможного распространения малярии на территории Республики Беларусь может служить изменение климата в сторону потепления, что создает благоприятные условия для размножения переносчика малярии. Учитывая эти обстоятельства, следует заключить, что своевременная диагностика малярии является важной мерой, позволяющей предотвратить распространение этого заболевания на территории нашей страны и препятствовать возврату эндемической заболеваемости.

■ ЭТИОЛОГИЯ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛЯРИИ

Малярия («болотная лихорадка») – группа антропонозных протозойных трансмиссивных болезней, возбудители которых передаются комарами рода *Anopheles*. Заболевание характеризуется преимущественным поражением клеток ретикулоэритроцитарной системы и эритроцитов человека и проявляется рецидивирующими лихорадкой с пароксизмами, анемией и гепатоспленомегалией.

После распада СССР малярия возродилась в Таджикистане (1994–2014 гг.), Армении (1997–2003 гг.), Азербайджане (1998–2012 гг.), Грузии (2000–2012 гг.).

Как уже отмечалось, малярия в прошлом являлась эндемичной для Беларуси, в настоящее время на территории страны она регистрируется в виде завозных случаев. Так, по данным статистики, в Республике Беларусь насчитывалось 5 завозных случаев заболевания в 2006, 2012 и 2014 гг., 16 – в 2019 и 2020 гг. и в общей сложности с 2000 г. 240 случаев заболевания.

На территории Беларуси, благодаря проведению мелиорации, не осталось эндемичных очагов малярии, однако по-прежнему имеется переносчик заболевания, который в любой момент может включиться в эпидемическую цепочку. Поэтому важна работа, направленная на своевременную клиническую и лабораторную диагностику малярии. Описывая клинические аспекты диагностики, следует отметить, что два последних поколения врачей не видели пациентов с малярией и лишь теоретически знакомы с клинической картиной этого заболевания. Нередко среди врачей-клиницистов отсутствует настороженность в отношении малярии, поэтому



не предпринимаются необходимые меры в отношении лабораторного обследования пациентов для исключения или подтверждения этого диагноза.

Малярия является антропонозным заболеванием. Источником инфекции служит человек (больной или паразитоноситель), в крови которого циркулируют зрелые половые формы плазмодиев (гаметоциты). Малярию у человека вызывают плазмодии 5 видов: *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale* – возбудители трехдневной малярии, *Plasmodium falciparum* – возбудитель тропической малярии, *Plasmodium malariae* – возбудитель четырехдневной малярии. Пятый вид – *Plasmodium knowlesi* – является возбудителем малярии обезьян – зоонозного заболевания, которое встречается преимущественно в Юго-Восточной Азии: резервуаром для этого возбудителя в природе являются макаки, хотя уже доказаны случаи передачи *P. knowlesi* посредством комаров от обезьян к человеку.

■ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Малярию по клиническому течению включают в группу лихорадок без видимого очага инфекции – острых заболеваний, проявляющихся только повышенной температурой тела при отсутствии симптомов, указывающих на конкретное заболевание или очаг инфекции. Именно поэтому при сохранении у пациента лихорадки неправильного типа более 5 сут. его необходимо в обязательном порядке обследовать на малярию [1–4].

Клиническая картина малярии проявляется высокой температурой, имеющей характер пароксизмов с тремя периодами: озноба, жара и обильного потоотделения. Заболевание начинается с признаков продрома в виде повышения температуры до фебрильных цифр, которое сопровождается неспецифическими симптомами интоксикации: слабостью, головной болью, снижением аппетита, болями в пояснице и суставах. Для периода озноба характерно нарастание температуры, далее в период жара температура стабилизируется на высоких цифрах, при этом озноб прекращается. Спустя некоторое время возникает обильная потливость и температура тела снижается до нормальных значений или субфебрильных цифр. Длительность периода озноба, как правило, составляет не более 1 часа, периода жара – 2–4 часа; третий период, характеризующийся обильной потливостью, длится от 3 до 4 часов. Таким образом, общая продолжительность малярийного пароксизма составляет от 5 до 9 часов.

После лихорадочного пароксизма начинается межприступный период апирексии, характеризующийся нормальной температурой и удовлетворительным самочувствием пациента. Длительность этого периода при трехдневной малярии составляет 40–45 часов, при четырехдневной – 59–60 часов, при тропической – 8–10 часов. Для выявления периода апирексии следует проводить измерение температуры тела каждые 2–3 часа в день с обязательной фиксацией результатов. Первоначально в межприступном периоде состояние пациентов остается удовлетворительным, но в дальнейшем по мере нарастания гемолитической анемии и гепатоспленомегалии развиваются общая слабость, головокружение и желтушность склер и кожи. Лихорадочные пароксизмы продолжаются 3–4 недели, после чего наступает клиническое выздоровление, однако сохраняются изменения со стороны селезенки: она уплотняется, размеры ее превышают размеры печени. Через 6–8 недель от начала заболевания могут возникать ранние рецидивы – особенно при ошибочном

диагнозе и неадекватном лечении. Снова возникает лихорадка с пароксизмами, но менее тяжелыми и более короткими, чем при первой атаке, которые могут протекать в том числе и субклинически. Через 6–8 месяцев могут развиваться поздние рецидивы со стертой симптоматикой, но выраженными пароксизмами.

Наиболее злокачественной является тропическая малярия, при которой отмечается высокая летальность как среди детей, так и среди взрослого населения. Для острого периода тропической малярии характерна высокая паразитемия, а лихорадка имеет неправильный характер, напоминая сепсис или тифо-паратифозное заболевание. С 3–14-х суток от начала болезни могут формироваться пароксизмы. Заболевание начинается с лихорадки и рвоты и в течение 1–2 суток может перейти в кому (церебральная форма малярии) или состояние шока с затрудненным дыханием и развитием респираторного дистресс-синдрома, генерализованными судорогами на фоне тяжелой анемии (уровень гемоглобина менее 60 г/л, а содержание эритроцитов менее $1,8 \times 10^{12}/л$) и гипогликемии (содержание глюкозы в крови менее 2,5 ммоль/л). Тяжелое течение тропической малярии обусловлено выраженной паразитемией: более 10% эритроцитов крови поражается плазмодиями. Кроме этого, тяжесть заболевания связана с особенностями его патогенеза с формированием на поверхности эритроцитов так называемых малярийных бугорков («knobs structure») за счет встраивания в оболочку эритроцита паразитарных белков. В результате происходит агрегация пораженных эритроцитов и их адгезия на эндотелии мелких кровеносных сосудов внутренних органов (головного мозга, легких, сердца, костного мозга и др.) с образованием так называемых паразитарных тромбов, которые по сути представляют собой адгезированные эритроциты, пораженные *Pl. falciparum*. Особенно опасно заболевание тропической малярией для детей до 14 лет, так как у них быстро развивается тяжелая анемия, тромбоцитопения, респираторная одышка, печеночная и почечная недостаточность.

Knowlesi-малярия, в отличие от других видов малярии, характеризуется ежедневными малярийными приступами, что обусловлено очень коротким циклом развития паразита. Для этого заболевания также характерна высокая паразитемия. У пациентов случаи тяжелой анемии не регистрируются, но нередко отмечается тромбоцитопения. Следует отметить, что эпидемиологическая роль человека как источника инфекции при Knowlesi-малярии весьма незначительна, поскольку образование гаметоцитов *Pl. knowlesi* в организме человека происходит в небольшом количестве.

Классическим способом лечения малярии является использование хинина, вводимого внутривенно, внутримышечно или орально – в зависимости от стадии развития заболевания и степени тяжести. Лекарством второго ряда является внутривенно вводимый артезунат или внутримышечный артемизинин или артемизинин. Изготавливаются эти препараты из китайской полыни. За синтез артемизина китайскому химику-фармацевту Ту Юю в 2015 году была присуждена Нобелевская премия. В Беларуси, кстати, также с древних времен существовал народный способ лечения «болотной лихорадки» отваром полыни. К широко применявшемуся в середине прошлого века хлорохину (делагилу) в большинстве стран с эндемичной малярией уже развилась резистентность, и поэтому его применение ограничено. При малярии важным является и синдромальное лечение – для коррекции тяжелой анемии, ацидоза, гипогликемии, предотвращения судорог, гипертермии и аспирационной пневмонии.



■ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика малярии основывается в первую очередь на результатах лабораторного исследования крови пациента. Для лабораторной диагностики малярии могут применяться методы световой микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ), а также серологические методы, основанные на принципе иммунохроматографии [5–8]. В Республике Беларусь основным лабораторным методом является микроскопия препаратов крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе.

Для выявления малярийных паразитов используют два типа препаратов крови – тонкий мазок и толстый мазок (толстую каплю). Из пробы крови пациента готовят не менее 3 препаратов толстых капель и 3 мазков крови [1, 6, 8]. На рис. 1 показано, как выглядят эти препараты.

Принципиальное отличие технологий изготовления этих препаратов состоит в том, что при приготовлении толстой капли крови мазок окрашивается без предварительной фиксации, что приводит к разрушению эритроцитов. В результате имеется возможность просмотреть под микроскопом более толстый слой крови. Однако вследствие разрушения эритроцитов при окрашивании нефиксированных мазков плазмодии уменьшаются в размерах и подвергаются деформации, а также лежат в поле зрения свободно. Именно поэтому толстая капля используется для выявления плазмодиев и подсчета их числа (определения степени паразитемии).

Следует иметь в виду, что при просмотре толстой капли не представляется возможным использовать такой важный диагностический признак, как изменение пораженных эритроцитов.

На рис. 2 представлено, как выглядят плазмодии малярии в толстой капле.

По методу Романовского – Гимзе плазмодии окрашиваются в толстой капле в те же цвета, что и в тонком мазке: ядро имеет различные оттенки красного, а цитоплазма – голубого или серовато-синего цвета.

При приготовлении тонкого мазка препарат фиксируется этиловым спиртом, что препятствует гемолизу эритроцитов, поэтому находящиеся в них плазмодии практически не деформируются, что показано на рис. 3. В результате становится возможным провести точную идентификацию вида малярийных плазмодиев и стадий их развития.

Микроскопия препаратов крови для выявления плазмодиев проводится при увеличении с иммерсионным объективом $\times 90$ – 100 и окуляром $\times 7$ – 10 при ярком освещении. По стандарту ВОЗ, исследование толстой капли крови должно быть основано на изучении не менее 100 полей зрения в препарате. Таким образом, заключение об отсутствии возбудителей малярии можно сделать только после отрицательных результатов исследования 100 полей зрения. В случае если в толстой капле паразиты обнаружены, то следует провести их видовую идентификацию, исследуя тонкий мазок [6, 8].

Согласно постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.03.2013 № 23 по результатам проведенных лабораторных исследований в медицинской документации должна быть указана следующая информация: выявленный вид или несколько видов возбудителя; стадии развития паразитов: трофозоиты, шизонты, гаметоциты; уровень интенсивности паразитемии [1].

Степень выраженности паразитемии может определяться двумя способами: путем подсчета среднего числа паразитов на одно поле зрения толстой капли

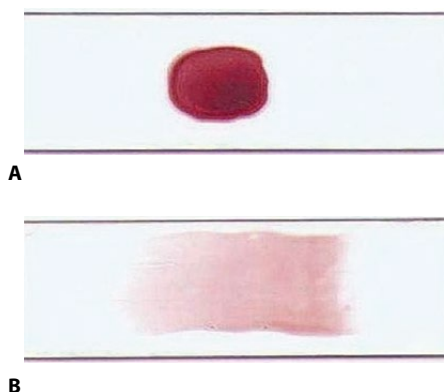


Рис. 1. Толстая капля (А) и тонкий мазок (В)
Fig. 1. Thick drop (A), and thin stroke (B)

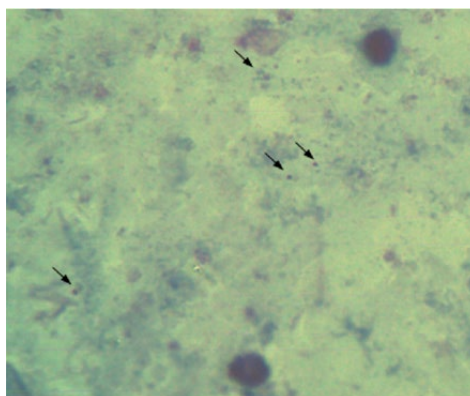


Рис. 2. Малярийные плазмодии в толстой капле (указаны стрелками); увеличение ×1000
Fig. 2. Malarial plasmodia in a thick drop (indicated by arrows); magnification ×1000

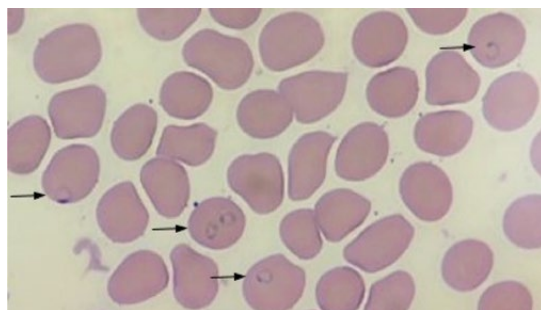


Рис. 3. Тонкий мазок: кольца *Pl. falciparum* в эритроцитах (пораженные эритроциты указаны стрелками); увеличение ×1000
Fig. 3. Thin stroke: *Pl. falciparum* rings in erythrocytes (affected erythrocytes are indicated by arrows); magnification ×1000

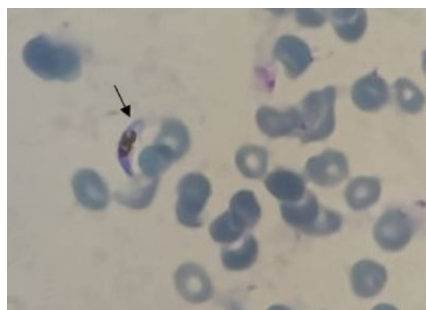


Рис. 4. Гаметоцит *Pl. falciparum* в тонком мазке (указан стрелкой); увеличение ×1000
Fig. 4. Gametocyte *Pl. falciparum* in a thin smear (indicated by an arrow); magnification ×1000

или путем подсчета численности паразитов по отношению к числу лейкоцитов (на 100 лейкоцитов). Безусловно, более точным и информативным методом является подсчет паразитов на 100 лейкоцитов.

Как уже было отмечено, для видовой идентификации малярийных плазмодиев необходимо обязательное исследование тонкого мазка. При малярии, вызванной *Pl. vivax*, *Pl. ovale* и *Pl. malaria*, в мазках крови можно обнаружить возбудителя болезни на разных стадиях его развития (кольцевидные, амёбовидные или зрелые трофозоиты, незрелые или зрелые шизонты, гаметоциты). При обычном течении тропической малярии в мазках обнаруживается возбудитель только в стадии колец (поскольку дальнейшее развитие *Pl. falciparum* проходит в капиллярах внутренних органов),



а также гаметоцитов. Однако при злокачественном течении тропической малярии в периферической крови можно встретить амёбовидные или зрелые трофозоиты, или шизонты. Такая картина крови сразу должна настораживать как врача клинической лабораторной диагностики, так и врача-клинициста, поскольку свидетельствует о развитии у пациента малярийной комы.

Дифференциация стадий и вида малярийного плазмодия в мазке крови осуществляется на основании характерных морфологических признаков. Юные (кольцевидные и амёбовидные) трофозоиты чаще всего имеют хорошо выраженную вакуоль и отличаются количеством и характером распределения цитоплазмы: у кольцевидного трофозоида цитоплазма распределена вокруг вакуоли в виде тонкого ободка, что придает ему форму кольца или перстня. Самые маленькие по размеру кольца у *Pl. falciparum* (1/6–1/5 диаметра эритроцита), при этом в одном эритроците может насчитываться 2–3 кольца. Два кольца в одном эритроците могут обнаруживаться и при паразитировании *Pl. vivax*, но кольца в этом случае более крупные по размеру – около 1/3–1/2 диаметра эритроцита. Кольцевидные трофозоиты *Pl. ovale* и *Pl. malaria* всегда расположены в эритроцитах только по одному.

Амёбовидный трофозоит имеет менее выраженную вакуоль и большее количество цитоплазмы, которая может быть компактной (у *Pl. malaria* и *Pl. ovale*) или неправильной формы с хорошо выраженными псевдоподиями – у *Pl. vivax*. Амёбовидные трофозоиты *Pl. malaria* и *Pl. ovale* схожи между собой, отличить их можно только по размеру ядра, которое у *Pl. ovale* более крупное. Зрелые трофозоиты, как правило, отличаются от юных форм отсутствием в цитоплазме вакуоли.

Шизонт – это многоядерная стадия паразита. Незрелый шизонт имеет округлую или овальную форму, внутри его цитоплазмы располагаются глыбки хроматина, которые представляют собой зачатки новых ядер. Эта стадия различается у разных видов плазмодия размером, количеством ядер и характером их расположения. Так, у *Pl. vivax* незрелый шизонт занимает почти весь эритроцит, содержит пигмент в виде крупных гранул и от 2 до 22 ядер. Количество ядер у *Pl. malaria* – от 6 до 12, они собраны вокруг кучки пигмента в виде лепестков маргаритки, незрелый шизонт более мелкий, чем у *Pl. vivax*. Незрелый шизонт у *Pl. ovale* занимает примерно половину объема эритроцита, содержит от 8 до 12 крупных ядер. Зрелые шизонты (устаревшее название – морула) представляют собой большое количество оформленных ядер, вокруг которых обособляются участки цитоплазмы. Количество ядер соответствует таковому у незрелых шизонтов.

Гаметоциты *Pl. vivax*, *Pl. ovale* и *Pl. malaria* круглые, почти полностью заполняют увеличенный эритроцит. Женские гаметоциты (макрогаметоциты) имеют относительно плотное, округлое или вытянутое ядро, расположенное асимметрично, реже – в центре клетки, у мужских (микрогаметоцитов) ядро крупное, рыхлое, с просветлениями. В отличие от других видов плазмодия, гаметоциты *Pl. falciparum* имеют характерную полулунную форму, как показано на рис. 4.

Гаметоциты в крови образуются только лишь после нескольких циклов деления паразита. При тропической малярии гаметоциты появляются в периферической крови не ранее чем через 8–10 суток от начала первых клинических проявлений; они способны длительно сохранять жизнеспособность – до месяца. Гаметоциты остальных видов плазмодиев образуются с первых суток заболевания, но срок их жизнеспособности существенно короче – как правило, 2–3 сут.

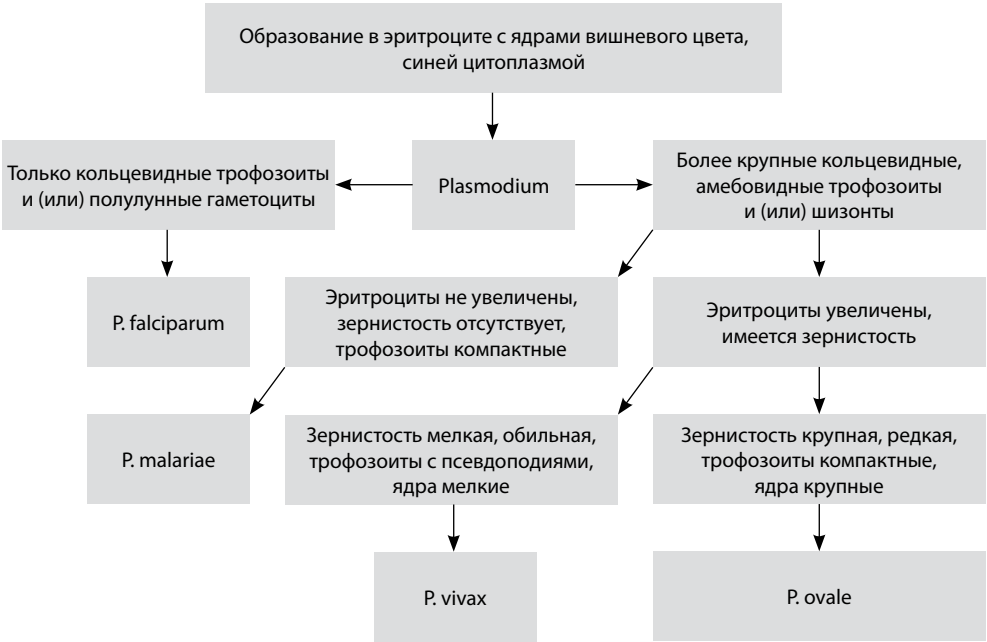


Рис. 5. Алгоритм дифференциальной диагностики малярийных плазмодиев в тонком мазке крови
Fig. 5. Algorithm for differential diagnosis of malarial plasmodia in a thin blood smear

Немаловажное значение для дифференцировки вида плазмодия в мазке крови имеет и морфология эритроцитов. Эритроциты, пораженные *Pl. vivax*, как правило, увеличиваются в размере, для них характерны гипохромия и наличие обильной мелкой зернистости красного цвета (зернистости Шюффнера). Также изменяется морфология эритроцитов и при наличии в них *Pl. ovale*: эритроциты увеличены в размере, гипохромны, могут быть овальной или фестончатой формы, в них наблюдается более крупная и редкая зернистость красного цвета (зернистость Джеймса). При паразитировании *Pl. malaria* и *Pl. falciparum* эритроциты не изменяются.

На рис. 5 отражен алгоритм выявления малярийных плазмодиев и установления их видовой принадлежности в тонком мазке крови [8].

Важно помнить, что отрицательный результат однократного микроскопического исследования крови не всегда свидетельствует об отсутствии малярии. При наличии клинических признаков диагноз малярии может быть отвергнут только на основании отрицательных результатов лабораторного исследования крови, проводимого в течение не менее 3 суток.

■ ВЫВОДЫ

1. Малярия является одним из самых распространенных в мире паразитарных заболеваний, сопровождающихся большим количеством тяжелых форм и имеющих высокую летальность. В Республике Беларусь ежегодно регистрируются единичные завозные случаи малярии. Учитывая наличие факторов, которые могут



способствовать возникновению местных случаев на территории Беларуси, врачам-клиницистам следует иметь настороженность в отношении заболеваемости малярией.

2. Клиническая лабораторная диагностика, позволяющая подтвердить диагноз малярии и установить ее вид, должна проводиться в соответствии с действующими рекомендациями и включать микроскопическое исследование препаратов крови – толстой капли и тонкого мазка.
3. Для оценки прогноза заболевания и эффективности проводимого лечения важно определять степень выраженности паразитемии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Sanitary norms and rules «Demands to organization anti-epidemic measures to prevent citizens from malaria drifting and spreading»*. Adopted by the Ministry of Healthcare of the Republic of Belarus 21.03.2013 № 23. National legal internet portal of the Republic of Belarus. Available at: <https://pravo.by>
2. Popov A., Barinova A., Tykmanaev A., Kozhevnikova G., Sergeeva V. (ed.) *Malaria: clinical, laboratory, epidemic diagnostics and disease treatment*. Moscow: Publishing House «Medical Information agency». 2019;264 p. (in Russian)
3. Ivanova M., Karpov I. *Malaria: teaching acid*. BSMU. 2013;40 p. (in Russian)
4. *Clinical protocols. Cases of infections, parasitic diagnostics and grown-up treatment*. Adopted by the Ministry of Healthcare of the Republic of Belarus 13.12.2018 № 94. (in Russian)
5. Sergeev V., Baranova A., Arsenteva A. Malaria importance from Afghanistan in the USSR. *Med. parat.* 1992;3:15–17. (in Russian)
6. *Microscopic diagnosis of malaria*. World Health Organization. Copenhagen. 2000;87 p.
7. Semenov V. *Infectious diseases*. M.: Medical literature. 2014;496 p. (in Russian)
8. Shileiko I., Baturevich L., Alekhovich L. *Laboratory diagnosis of malaria: teaching acid*. BelMAPO. 2022;29 p. (in Russian)



Мовчан Л.В.✉, Шман Т.В., Ивуть У.С.

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

Содержание лейкозных стволовых клеток в костном мозге пациентов с различными вариантами острого миелоидного лейкоза

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Мовчан Л.В. – концепция и дизайн исследования, обработка данных, написание текста; Шман Т.В. – концепция и дизайн исследования, обработка данных, редактирование; Ивуть У.С. – сбор данных, обзор литературы.

Подана: 03.10.2023

Принята: 09.01.2024

Контакты: movchan-l@mail.ru

Резюме

Цель. Определить количество потенциальных лейкозных стволовых клеток и оценить их содержание в зависимости от клинических факторов и биологических особенностей острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у пациентов детского возраста.

Материалы и методы. В исследование были включены 63 пациента с первично установленным диагнозом ОМЛ, получавших лечение в рамках протокола ОМЛ-ММ-2014 и ОМЛ-ММ-2021. Анализ количественного содержания лейкозных стволовых клеток по фенотипу CD34⁺CD38⁻ проводили в образцах костного мозга с помощью 7–10-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания.

Результаты. Выявлено, что количество CD34⁺CD38⁻ значительно выше при ОМЛ, относящихся к M0, M1, M2 FAB-вариантам, по сравнению с M7, M5. Содержание лейкозных стволовых клеток значительно выше у пациентов с наличием экспрессии на опухолевых клетках таких маркеров, как CD34, CD123, CD13, HLA-DR, CD25, CD200. Установлено, что статистически значительно выше количество CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с наличием молекулярно-генетических перестроек AML1/ETO, CBFB-MYH11 в лейкоэмических клетках по сравнению с перестройкой FLT3-ITD и отсутствием исследуемых перестроек.

Заключение. Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать лейкозные стволовые клетки у пациентов с ОМЛ. Установлена взаимосвязь содержания лейкозных стволовых клеток с морфологическими FAB-вариантами лейкоза, с экспрессией на опухолевых клетках определенных линейно-специфичных и aberrантных маркеров, а также с молекулярно-генетическими перестройками.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, лейкозные стволовые клетки, проточная цитометрия, иммунофенотипирование, молекулярно-генетические перестройки, FAB-классификация



Liudmila V. Movchan✉, Tatsiana V. Shman, Ulyana S. Ivuts

Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Leukemic Stem Cell Content in the Bone Marrow of Patients with Various Types of Acute Myeloid Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Liudmila V. Movchan – study concept and design, data processing, text writing; Tatsiana V. Shman – study concept and design, data processing, editing; Ulyana S. Ivuts – data collection, literature review.

Submitted: 03.10.2023

Accepted: 09.01.2024

Contacts: movchan-l@mail.ru

Abstract

Purpose. To determine potential leukemic stem cell number and evaluate their content in relation to clinical factors and biological features of acute myeloid leukemia (AML) in pediatric patients.

Materials and methods. The study included 63 patients with newly diagnosed AML who were treated under the AML-MM-2014 and AML-MM-2021 protocols. Leukemic stem cell quantification by CD34+CD38 phenotype was performed in bone marrow samples using 7–10-color flow cytometry at the time of disease diagnosing.

Results. It was revealed that the number of CD34+CD38– was significantly higher in AML related to M0, M1, M2 FAB variants compared to M7, M5. Leukemic stem cell content was significantly higher in patients exhibiting expression of such markers as CD34, CD123, CD13, HLA-DR, CD25, and CD200 on tumor cells. It was found that the number of CD34+CD38– cells was statistically significantly higher in patients presenting molecular genetic rearrangements AML1/ETO, CBFb-MYH11 in leukemic cells compared to the FLT3-ITD rearrangement and the absence of the studied rearrangements.

Conclusion. Multicolor flow cytometry allows identifying leukemic stem cells in AML patients. A correlation was established between leukemic stem cell content and morphological FAB variants of leukemia, the expression of certain lineage-specific and aberrant markers on tumor cells, as well as molecular and genetic rearrangements.

Keywords: acute myeloid leukemia, leukemic stem cells, flow cytometry, immunophenotyping, molecular-genetic rearrangements, FAB classification

■ ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) – это гетерогенная группа злокачественных заболеваний гемопоэтической ткани, характеризующаяся пролиферацией и накоплением миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, периферической крови, печени, селезенке, реже в некроветворных органах. ОМЛ составляют около 20% среди всех острых лейкозов детского возраста и отличаются тяжелым и агрессивным течением [1, 2].

Основными проблемами выживаемости пациентов с ОМЛ являются резистентность к проводимой терапии, а также рецидивы заболевания, исход которых крайне

неблагоприятный [2]. Считается, что причиной рецидивов и резистентности к применяемым химиотерапевтическим препаратам является наличие среди общего пула опухолевых клеток популяции лейкозных стволовых клеток (ЛСК), которая способна инициировать и поддерживать рост опухоли [3–5].

В случае с ОМЛ потенциальные ЛСК с фенотипом CD34⁺CD38⁻ могут экспрессировать различные вариации aberrантных маркеров, позволяющие отличить их от нормальных стволовых клеток. К таким маркерам относятся CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3, CD200 [7–16]. Определение количества ЛСК проводят с целью достоверного прогноза исхода заболевания, выбора тактики терапии и непосредственного поиска мишеней для таргетной терапии, которая в первую очередь будет направлена на уничтожение пула ЛСК [7, 8, 14, 18, 21, 26, 27].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований относительно ЛСК при острых лейкозах, на сегодняшний день мало работ, посвященных оценке прогностического значения инициального содержания этой популяции клеток при остром лимфобластном лейкозе и остром миелоидном лейкозе у детей. В то же время существует ряд инициальных клинических и биологических факторов, различных критериев оценки ответа на терапию, связь которых с количеством ЛСК остается неизученной в детской онкогематологии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить количество потенциальных лейкозных стволовых клеток и оценить их содержание в зависимости от клинических факторов и биологических особенностей острого миелоидного лейкоза у пациентов детского возраста.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 63 пациента с первично установленным диагнозом ОМЛ, получавших лечение в рамках протокола ОМЛ-ММ-2014 и ОМЛ-ММ-2021. Диагноз был установлен в соответствии с ВОЗ-классификацией на основании оценки иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток, морфологической FAB-классификации, а также по наличию специфических цитогенетических и молекулярно-генетических перестроек. Среди исследованной группы у пациентов были диагностированы следующие варианты ОМЛ согласно FAB-классификации: M0 – 1% (1/63), M1 – 14% (9/63), M2 – 35% (22/63), M4 – 13% (8/63), M5 – 24% (15/63), M7 – 13% (8/63). Медиана возраста пациентов составила 9 лет (от 0 до 23 лет). В группе исследованных пациентов мальчики составляли 62% (39/63), девочки – 38% (24/63).

Определение количества ЛСК в образцах КМ по фенотипу CD34⁺CD38⁻ и оценку экспрессии на них таких маркеров, как CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3, CD200, CD117, проводили с помощью 7–10-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания. Для этого использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромными метками в соответствии с используемой панелью:

1. Tim-3 FITC/CD200 PE/CD34 ECD/CD25 PE-Cy5/CD96 PE-Cy7/CD38 APC-AF750/CD45 KrO.
2. CD38 FITC/CD99 PE/ CD34 ECD/CD33 PE-Cy5/CD117 PE-Cy7/CLL-1 APC/CD123 APC-AF700/CD45 APC-AF750/HLA-DR PB/CD45 KrO.



Пробоподготовка и анализ количества лейкозных стволовых клеток по характерному иммунофенотипу CD34⁺CD38⁻ осуществлялись согласно ранее описанной методике [6].

Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter) в программе CXP. Учитывали не менее 500 тысяч клеток.

Анализ содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ среди CD45^{low} клеток также провели в 15 образцах костного мозга здоровых доноров (доноры для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток).

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программу Statistica 6.0. Результаты представляли в процентных показателях, в виде значений медианы и диапазона данных (25–75 перцентили). Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с использованием теста Манна – Уитни. Результаты считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ

В образцах костного мозга здоровых доноров медиана количества клеток с иммунофенотипом CD34⁺CD38⁻ среди CD45^{low} клеток составила 0,49% (0,41–0,5). Для пациентов с ОМЛ установлено, что медиана количества CD34⁺CD38⁻ клеток составила 5,3% (0,8–9,1), $p < 0,05$. Однако на сегодняшний день известно, что иммунофенотип CD34⁺CD38⁻ характерен как для ЛСК, так и для нормальных стволовых кроветворных клеток [3–5]. Поэтому для подтверждения принадлежности клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ при ОМЛ к опухолевому клону необходимо использовать дополнительные маркеры, отличающие их от нормальных аналогов [25]. К таким маркерам относятся CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3 [9–16].

Показано, что среди популяции CD34⁺CD38⁻ позитивная экспрессия CD123 наблюдалась в 37% (23/58) случаев. Наличие экспрессии какого-либо из таких аберрантных антигенов, как CLL-1, CD25, CD96, Tim-3, CD200, на CD34⁺CD38⁻ популяции установлено в 79% (50/56) случаев. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в случае с ОМЛ популяцию клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ можно рассматривать именно как ЛСК.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от клинических факторов

В работе был проведен анализ количества ЛСК в зависимости от пола, инициального содержания лейкоцитов в периферической крови, поражения центральной нервной системы, FAB-классификации у пациентов с ОМЛ.

Не было выявлено достоверных различий в содержании CD34⁺CD38⁻ популяции в зависимости от пола, инициального содержания лейкоцитов в ПК ($>/<50\,000$ кл/мкл), поражения центральной нервной системы.

В зависимости от установленной при диагностике FAB-классификации мы разделили пациентов на 4 группы. Группу 1 составили пациенты с минимальной дифференцировкой бластных клеток M0, M1 и M2, группу 2 – пациенты с M7, группу 3 – пациенты с M4 и группу 4 – пациенты с M5 морфологическими вариантами ОМЛ.

Таблица 1
Содержание ЛСК в группах пациентов с ОМЛ в зависимости от FAB-варианта
Table 1
LSC content in groups of AML patients depending on FAB-variant

Признак	N=63	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Медиана (25–75), % n=63	P
1-я группа (M0, M1 и M2)	32	7,2 (4,5–12,3)	–
2-я группа (M7)	8	0,58 (0,08–5,35)	0,006
3-я группа (M4)	8	4,4 (1,2–7,4)	>0,05
4-я группа (M5)	15	1,25 (0,3–5,1)	0,003

Анализ содержания клеток с фенотипом ЛСК среди выделенных групп показал, что статистически значимо большее количество CD34⁺CD38⁻ клеток наблюдалось в группе 1 по сравнению с группой 2 и группой 4 (табл. 1). Разницы в содержании ЛСК между 1-й и 3-й группами не выявлено.

Исходя из полученных результатов, очевидно, что более высокое содержание CD34⁺CD38⁻ клеток характерно для ОМЛ с минимальной дифференцировкой по сравнению с ОМЛ с выраженной линейной направленностью.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток

На первом этапе данной части работы мы оценили взаимосвязь между содержанием клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ и особенностями экспрессии миелоидных дифференцировочных маркеров, таких как CD34, CD117, CD123, CD13, CD33, CD65, HLA-DR, CLL-1, на опухолевых клетках у детей с ОМЛ.

Достоверные различия в содержании исследуемой популяции ЛСК наблюдались в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии на поверхности опухолевых клеток ранних дифференцировочных маркеров. Так, в группе пациентов, на лейкозных клетках которых присутствовала экспрессия CD34 (рис. 1А), содержание CD34⁺CD38⁻ клеток было достоверно выше и медиана составила 6,9% (5,3–10,9) по сравнению с группой пациентов, у которых экспрессия CD34 отсутствовала, медиана равна 0,4% (0,1–1,5), $p<0,001$. Статистически значимо выше количество ЛСК было у пациентов, у которых на бластах экспрессировался маркер CD123 (рис. 1В), медиана составила 6,3% (2,2–10,1), по сравнению с пациентами, у которых экспрессия данного антигена отсутствовала, медиана 3,9% (0,3–7,1), $p=0,029$.

Также достоверные различия в содержании ЛСК наблюдались в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии на поверхности лейкозных клеток маркеров CD13 и HLA-DR (рис. 2).

Выявлено, что в группе пациентов, на опухолевых клетках которых присутствовала экспрессия антигена CD13 (рис. 2А), содержание CD34⁺CD38⁻ клеток было достоверно выше по сравнению с таковым в группе пациентов, у которых экспрессия данного маркера отсутствовала: 6,3% (2,7–9,7) и 2,0% (0,3–5,3) ($p=0,01$). Аналогично в случаях позитивной экспрессии HLA-DR (рис. 2В) содержание ЛСК было значимо

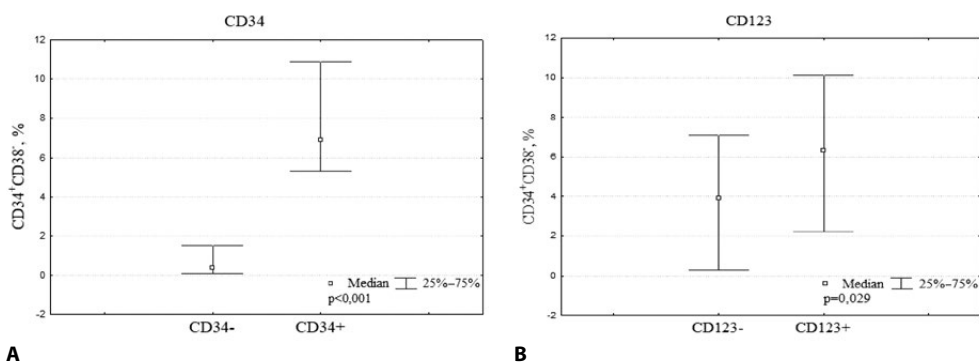


Рис. 1. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD34 (А) и CD123 (В) на опухолевых клетках
Fig. 1. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD34 (A) and CD123 (B) markers expression on tumor cells

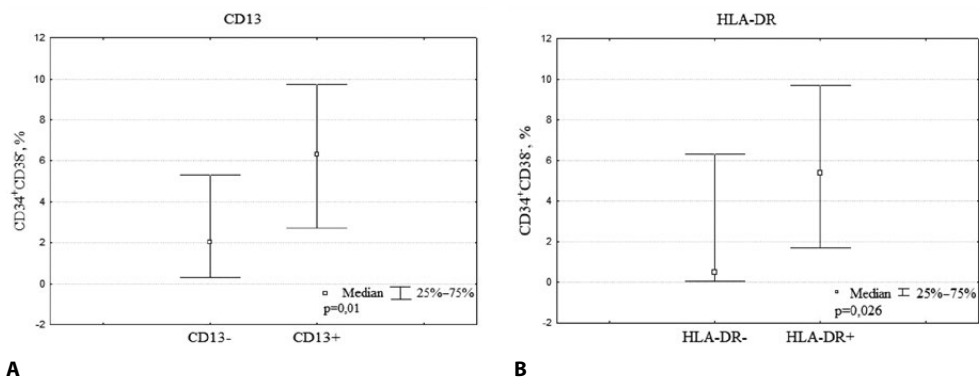


Рис. 2. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD13 (А) и HLA-DR (В) на опухолевых клетках
Fig. 2. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD13 (A) and HLA-DR (B) markers expression on tumor cells

выше в противоположность отсутствию его на опухолевых клетках: 5,4% (1,7–9,7) и 0,5% (0,06–6,3) (p=0,026).

Различия в содержании количества клеток с фенотипом ЛСК в зависимости от экспрессии на лейкозных клетках таких антигенов, как CD117, CD65, CLL1 (CD371), не выявлены.

В ходе анализа взаимосвязи aberrантной экспрессии на бластах при ОМЛ маркеров других линий дифференцировки установлено статистически значимое высокое содержание популяции ЛСК у пациентов с положительной экспрессией маркеров CD25 и CD200 (рис. 3).

Так, медиана количества CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с положительной экспрессией антигена CD25 была достоверно выше и составляла 6,3% (5,1–9,7), тогда как в случае его отсутствия – 2,9% (0,3–7,3) (p=0,02). Также и для маркера CD200 медиана

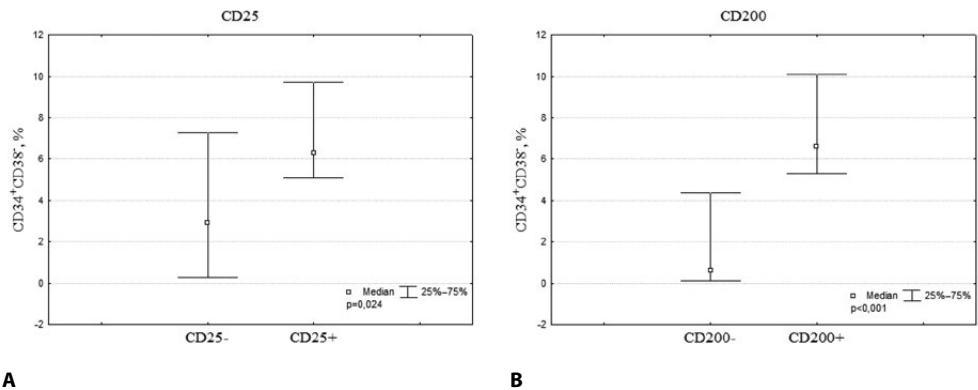


Рис. 3. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD25 (А) и CD200 (В) на опухолевых клетках
Fig. 3. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD25 (A) and CD200 (B) markers expression on tumor cells

количества CD34⁺CD38⁻ клеток составляла 6,6% (5,3–10,1) в случае его позитивной экспрессии на бластах и 0,6% (0,1–4,4) при отсутствии экспрессии (p<0,001). Однако разницы в содержании количества клеток с фенотипом ЛСК в зависимости от экспрессии aberrantных антигенов CD56, CD7, Tim-3 (CD366) и CD96 не выявлено.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от молекулярно-генетических перестроек

Также в работе мы проанализировали содержание клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ во всей выборке пациентов с ОМЛ в зависимости от наличия молекулярно-генетических перестроек. Для исследуемой группы пациентов были проанализированы наиболее часто встречаемые при ОМЛ у пациентов детского возраста перестройки, такие как AML1/ETO, CBFb-MYH11, FLT3-ITD, реаранжировки с участием гена MLL (табл. 2).

Таблица 2
Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с ОМЛ в зависимости от молекулярно-генетических перестроек
Table 2
Content of CD34⁺CD38⁻ cells in AML patients depending on molecular genetic rearrangements

Признак	N=63	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Медиана (25–75), %	P*	P [#]
AML1/ETO	11	9,1 (5,3–13)	–	>0,05
CBFb-MYH11	5	9,7 (5,4–12)	>0,05	–
MLL	6	0,8 (0,4–10)	>0,05	>0,05
FLT3-ITD	8	3,3 (1,9–6,1)	0,03	0,03
Нет перестр. / др.	33	4,4 (0,3–7,3)	0,01	0,01

Примечание: значение p по сравнению с группой пациентов с перестройками AML1/ETO (*), CBFb-MYH11 (#).



В ходе анализа выявлено, что содержание ЛСК достоверно не различается между группами пациентов с перестройками AML1/ETO и CBFb-MYH11. Таким образом, согласно табл. 2 статистически значимое более высокое содержание клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ было характерно для пациентов с наличием молекулярно-генетических перестроек AML1/ETO и CBFb-MYH11 по сравнению с пациентами, у которых была выявлена перестройка FLT3-ITD, а также по сравнению с пациентами, у которых не было выявлено исследуемых перестроек (или присутствуют неисследованные перестройки). Медиана содержания клеток с фенотипом ЛСК также была выше в группах пациентов с AML1/ETO и CBFb-MYH11 по сравнению с группой пациентов, где были выявлены реаранжировки с участием гена MLL, однако различия не достигли показателей достоверности.

Схожие результаты были получены и другими исследовательскими группами при изучении иммунофенотипа ЛСК у взрослых пациентов с ОМЛ [22, 25]. Исследования показали, что по сравнению с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками ЛСК демонстрируют на своей поверхности экспрессию какого-либо одного или нескольких одновременно aberrантных маркеров: CD25 [9, 15], CD32 [9], CD44 [10, 15], CD96 [11, 15], CD123 [12–15], CLL-1 [15, 21, 24, 25], Tim-3 [15], CD200 [16]. В работе Chavez-Gonzalez A. и соавторов описана высокая экспрессия маркеров CD123 и CD96 на популяции CD34⁺CD38⁻ и CD34⁺CD38⁺ у пациентов детского возраста с ОМЛ по сравнению с нормальными клетками-предшественниками [17]. Согласно полученным данным, а также результатам зарубежных исследований, высокая гетерогенность экспрессии ЛСК-специфичных маркеров у пациентов с ОМЛ не позволяет использовать какой-то единственный поверхностный маркер для выявления ЛСК [3–11, 16, 19]. Использование в иммунофенотипической панели именно вариации aberrантных маркеров позволяет с высокой специфичностью оценивать содержание ЛСК как на момент диагностики, так и на этапах проводимой химиотерапии. Специфичная идентификация ЛСК и их дискриминация от нормальных гемопоэтических клеток могли бы быть использованы для стратификации пациентов на группы риска, а также для прогноза развития рецидива заболевания [23]. Помимо специфичности исследования ЛСК, оценка экспрессии данных маркеров имеет большое значение для возможности разработки и применения антителозависимой таргетной терапии, которая будет направлена на уничтожение популяции этих высокорезистентных клеток [18, 21]. Отдельные зарубежные исследования также показали, что положительная экспрессия некоторых ЛСК-специфичных маркеров на момент диагностики ассоциируется с плохим прогнозом исхода заболевания у взрослых пациентов с ОМЛ. Например, экспрессия CD123 коррелирует с плохим ответом на проводимую химиотерапию [19]. А aberrантная экспрессия CD25 также ассоциируется с плохим прогнозом при ОМЛ [20]. Исследователи из Японии под руководством Т. Yabushita показали в своей работе, что одномоментная экспрессия на бластах при ОМЛ трех или двух маркеров из CD25, CD96, CD123 достоверно ассоциируется с плохим ответом на терапию, а также с короткой 3-летней общей выживаемостью по сравнению с отсутствием экспрессии данных маркеров или экспрессией только одного из них [26].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать ЛСК у пациентов с ОМЛ. Установлено, что количество ЛСК достоверно выше при ОМЛ,

относящихся к M0, M1, M2 FAB-вариантам, по сравнению с M7, M5. Выявлено статистически значимо высокое содержание ЛСК у пациентов с наличием экспрессии на опухолевых клетках таких маркеров, как CD34, CD123, CD13, HLA-DR и CD25, CD200. В зависимости от молекулярно-генетических перестроек показано, что содержание ЛСК достоверно выше у пациентов с перестройками AML1/ETO, CBFB-MYH11 по сравнению с перестройкой FLT3-ITD и отсутствием исследуемых перестроек.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khwaja A., Björkholm M., Gale R.E. Acute myeloid leukemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:1–22. doi: 10.1038/nrdp.2016.10
2. Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute Myeloid Leukemia – Past, Present, and Future. *J Clin Med*. 2022;11:1–16. doi: 10.3390/jcm11030504
3. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645–648. doi: 10.1038/367645a0
4. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3:730–737. doi: 10.1038/nm0797-730
5. Becker M.W., Jordan C.T. Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions. *Blood Rev*. 2011;25:75–81. doi: 10.1016/j.blre.2010.11.001
6. Movchan L.V., Shman T.V., Aleynikova O.V. Content of immature CD34+CD38– and CD34+CD38–CD19+ subpopulations in acute lymphoblastic leukemia in children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2012;4:69–74. (in Russian)
7. Xu X., Wang J., Tong T. A self-assembled leucine polymer sensitizes leukemic stem cells to chemotherapy by inhibiting autophagy in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2022;1:2344–2355. doi: 10.3324/haematol.2021.280290
8. Pollyea D.A., Jordan C.T. Therapeutic Targeting of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Blood*. 2017;129:1627–1635. doi: 10.1182/blood-2016-10-696039
9. Saito Y., Kitamura H., Hijikata A., Tomizawa-Murasawa M., Tanaka S., Takagi S. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Sci Transl Med*. 2010;2. doi: 10.1126/scitranslmed.3000349
10. Jin L., Hope K.J., Zhai Q., Smadja-Joffe F., Dick J.E. Targeting of CD44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Nat Med*. 2006;12:1167–1174. doi: 10.1038/nm1483
11. Hosen N., Park C.Y., Tatsumi N., Oji Y., Sugiyama H., Gramatzki M. CD96 is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104. doi: 10.1073/pnas.0704271104
12. Jordan C.T., Upchurch D., Szilvassy S.J., Guzman M.L., Howard D.S., Pettigrew A.L. The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain is a Unique Marker for Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells. *Leukemia*. 2000;14:1777–1784. doi: 10.1038/sj.leu.2401903
13. Jin L., Lee E.M., Ramshaw H.S., Busfield S.J., Peoppl A.G., Wilkinson L. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5:31–42. doi: 10.1016/j.stem.2009.04.018
14. Vergez F., Nicolau-Travers M.L., Bertoli S., Rieu J.B., Tavition S., Bories P. CD34(+)CD38(-)CD123(+) Leukemic Stem Cell Frequency Predicts Outcome in Older Acute Myeloid Leukemia Patients Treated by Intensive Chemotherapy But Not Hypomethylating Agents. *Cancers*. 2020;12. doi: 10.3390/cancers12051174
15. Goyama S., Wunderlich M., Mulloy J.C. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood*. 2015;125:2630–2640. doi: 10.1182/blood-2014-11-570218
16. Herbrich S., Baran N., Cai T. Overexpression of CD200 is a stem cell-specific mechanism of immune evasion in AML. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2021;9. doi: 10.1136/jitc-2021-002968
17. Chavez-Gonzalez A., Dorantes-Acosta E., Moreno-Lorenzana D. Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on Different Hematopoietic Cell Populations from Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Archives of Medical Research*. 2014;45:343–350. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.04.001
18. Pollyea D.A., Jordan C.T. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129:1627–1635. doi: 10.1182/blood-2016-10-696039
19. Riccioni R., Rossini A., Calabro L. Immunophenotyping features of acute myeloid leukemias overexpression The interleukin 3 receptor alpha chain. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1511–1517. doi: 10.1080/104281090310001646031
20. Cerny J., Yu H., Ramanathan M. Expression of CD25 independently predict early treatment failure of acute myeloid leukemia (AML). *Br J Haematol*. 2013;160:262–266. doi: 10.1111/bjh.12109
21. Hongbing Ma, Iyer Swaminathan Padmanabhan. Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12. doi: 10.1186/s13045-019-0726-5
22. Marchand T., Pinho S. Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities. *Front Immunol*. 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.775128
23. Terwijn M., Zeijlmaker W., Kelder A. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*. 2014;9. doi: 10.1371/journal.pone.0107587
24. Van Rhenen A., Van Dongen G.A., Kelder A., Rombouts E.J., Feller N. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 2007;110:2659–2666. doi: 10.1182/blood-2007-03-083048
25. Van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., Feller N., Nieuwint A.W. Aberrant marker expression patterns on the CD34+ CD38– stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*. 2007;21:1700–1707. doi: 10.1038/sj.leu.2404754
26. Yabushita T., Satake H., Maruoka H. Expression of multiple leukemic stem cell markers is associated with poor prognosis in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia&Lymphoma*. 2017;59:2144–2151. doi: 10.1080/10428194.2017.1410888
27. Zeijlmaker W., Grob T., Meijer R. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33:1102–1112. doi: 10.1038/s41375-018-0326-3



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.2.006>



Юревич В.В.¹, Корнелюк О.А.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

Состояние гуморального иммунитета и статус витамина D у детей с экссудативным средним отитом на этапе их подготовки к хирургическому лечению

Конфликт интересов: не заявлен.

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

Подана: 04.10.2023

Принята: 18.03.2024

Контакты: tkachenkocat@mail.ru

Резюме

Введение. Существуют данные о том, что иммунный дисбаланс является одной из основных причин образования экссудата среднего уха. Известно, в частности, что определенную роль в развитии и рецидивировании среднего отита играет аллергия. Существенное влияние на иммунную систему оказывает витамин D. Показано, что дефицит кальциферола способен усилить проявления аллергической реакции, что в свою очередь может приводить к рецидивированию среднего отита с формированием экссудата.

Цель. Провести сопоставительное исследование показателей клинико-лабораторных тестов, отражающих состояние местного и общего иммунитета, аллергии, содержания витамина D сыворотки крови, с особенностями морфологической картины слизистой оболочки носа детей с экссудативным средним отитом на этапе подготовки их к хирургическому лечению.

Материалы и методы. Для установления показателей лабораторных тестов, отражающих состояние гуморального иммунитета и содержание витамина D сыворотки крови в период максимально выраженного проявления клинических симптомов заболевания – на этапе подготовки к хирургическому лечению, проведено одномоментное когортное исследование 50 пациентов детского возраста, среди которых было 30 пациентов с экссудативным средним отитом и 20 практически здоровых детей, составивших группу сравнения, по возрастно-половому составу соответствующую группе пациентов, страдающих экссудативным средним отитом.

Результаты. У всех пациентов выполнено определение концентрации в сыворотке крови иммуноглобулинов A, G, M, E и витамина D. Показано статистически значимое снижение среднего уровня витамина D ($27,15 \pm 3,54$ мкг/л), иммуноглобулинов A ($1,08 \pm 0,17$ г/л), G ($9,22 \pm 0,70$ г/л) и увеличение концентрации иммуноглобулина E ($85,01 \pm 20,57$ МЕ/мл) у детей с экссудативным средним отитом по сравнению с аналогичными данными, полученными у здоровых детей ($p < 0,05$). Проведено

исследование риноцитограмм. Установлено, что среднее процентное количество эозинофилов в окрашенных препаратах слизистой полости носа статистически значимо увеличено ($9,35 \pm 3,18\%$) у пациентов с экссудативным средним отитом по сравнению с аналогичными значениями у представителей группы сравнения ($2,87 \pm 1,15\%$; $p < 0,05$), что может указывать на участие аллергического фактора в этиологии экссудативного среднего отита у детей.

Заключение. У пациентов с экссудативным средним отитом наблюдалось нарушение состояния гуморального иммунитета, выражающееся в статистически значимом снижении показателей среднего уровня иммуноглобулинов A ($1,08 \pm 0,17$ г/л) и G ($9,22 \pm 0,70$ г/л) по сравнению с аналогичными значениями у здоровых детей ($p < 0,05$), в снижении концентрации витамина D ($27,15 \pm 3,54$ мкг/л; $p < 0,05$), увеличении иммуноглобулина E ($85,01 \pm 20,57$ МЕ/мл) и процентного содержания эозинофилов в риноцитограмме ($9,35 \pm 3,18\%$) по сравнению с сопоставляемыми показателями группы сравнения ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о значимости влияния аллергического фактора на формирование и рецидивирование экссудативного среднего отита. Полученные данные ориентируют на осуществление дальнейшего поиска факторов риска формирования экссудата в барабанной полости в патогенетически значимом направлении и обоснование целесообразности медицинской профилактики при наличии лабораторных признаков гиповитаминоза D.

Ключевые слова: экссудативный средний отит у детей, иммуноглобулины A, G, M, E, витамин D, риноцитограмма

Yurevich V.¹, Karnialiuk 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

State of Humoral Immunity and Vitamin D Status in Children with Exudative Otitis Media at the Stage of their Preparation for Surgical Treatment

Conflict of interest: nothing to declare.

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

Submitted: 04.10.2023

Accepted: 18.03.2024

Contacts: tkachenkocat@mail.ru

Abstract

Introduction. There is evidence that immune imbalance is one of the main causes of middle ear exudate. Particularly, it is known that allergies play a certain role in otitis media development and recurrence. Vitamin D significantly affects the immune system. It has been shown that calciferol deficiency can enhance allergic reaction manifestations that, in its turn, may lead to otitis media recurrence with exudate formation.

Purpose. To conduct a comparative study of clinical and laboratory test findings reflecting local and general immunity state, allergies, vitamin D content in blood serum, with specific



morphological picture of the nasal mucosa in children with exudative otitis media at the stage of preparing them for surgical treatment.

Materials and methods. To establish laboratory test values reflecting humoral immunity state and serum vitamin D content during the period of most pronounced manifestation of clinical symptoms of the disease – at the stage of preparation for surgical treatment, a one-stage cohort study of 50 pediatric patients was conducted, including 30 patients with exudative otitis media and 20 practically healthy children representing a comparison group corresponding to the group of exudative otitis media patients in terms of age and gender composition.

Results. In all patients, serum immunoglobulins A, G, M, E and vitamin D levels were determined. A statistically significant decrease in the average vitamin D level ($27.15 \pm 3.54 \mu\text{g/l}$), immunoglobulins A ($1.08 \pm 0.17 \text{ g/l}$) and G ($9.22 \pm 0.70 \text{ g/l}$) levels, and an increase in immunoglobulin E level ($85.01 \pm 20.57 \text{ IU/ml}$) in exudative otitis media children in comparison with similar data obtained in healthy children ($p < 0.05$) were revealed. Rhinocytograms analysis was carried out. It was established that the average percentage of eosinophils in stained preparations of the nasal mucosa was statistically significantly increased ($9.35 \pm 3.18\%$) in exudative otitis media patients compared to similar values in the comparison group participants ($2.87 \pm 1.15\%$; $p < 0.05$), which may be indicative of allergic factor involvement in the etiology of exudative otitis media in children.

Conclusion. Patients with exudative otitis media exhibited impaired humoral immunity state, manifested by a statistically significant decrease in average immunoglobulin A ($1.08 \pm 0.17 \text{ g/l}$) and G ($9.22 \pm 0.70 \text{ g/l}$) levels compared to similar values in healthy children ($p < 0.05$), decreased vitamin D level ($27.15 \pm 3.54 \mu\text{g/l}$; $p < 0.05$), increased immunoglobulin E levels ($85.01 \pm 20.57 \text{ IU/mL}$) and eosinophils percentage in rhinocytograms ($9.35 \pm 3.18\%$) over against comparable values in the comparison group ($p < 0.05$), which may be indicative of the significance of allergic factor impact on exudative otitis media formation and recurrence. The data obtained suggest further search for risk factors of exudate formation in the tympanic cavity and justification of medical prevention in case of D hypovitaminosis laboratory signs.

Keywords: exudative otitis media in children, immunoglobulins A, G, M, E, vitamin D, rhinocytogram

■ ВВЕДЕНИЕ

Экссудативный средний отит (ЭСО) – распространенное заболевание у детей, протекающее бессимптомно и являющееся одной из основных причин потери слуха в детском возрасте. Экссудат в среднем ухе может сохраняться месяцами и негативно влиять на качество жизни ребенка, способствуя рецидивированию острого среднего отита и/или формированию хронического среднего отита [1, 7]. При ЭСО целостность барабанной перепонки не нарушена.

За последние десятилетия многие авторы отмечают наибольший (15–17%) рост заболеваемости ЭСО среди всех заболеваний уха. Всемирная организация здравоохранения прогнозирует к 2030 г. увеличение числа лиц с социально значимыми нарушениями слуха на 30% [6].

Известно, что в развитии заболевания решающую роль играет евстахиева труба. Вирусные инфекции способствуют повышению отрицательного давления в евстахиевой трубе, а чрезмерное производство цитокинов вследствие некорректной работы иммунной системы приводит к усилению выраженности воспалительного процесса. Накопление муцина снижает мукоцилиарный клиренс. Бактерии в составе биопленок, в свою очередь, способны управлять экспрессией соответствующих генов и взаимодействовать с другими патогенами, повышая их вирулентность. Аллергия также является одним из факторов риска, вызывая увеличение частоты встречаемости экссудативного среднего отита в 2–4,5 раза по сравнению с таковой у детей, не страдающих аллергией [7]. Все это является решающими событиями в патогенезе ЭСО.

С развитием молекулярной биологии и иммунологии все больше исследователей полагают, что неадекватный иммунный ответ является основной причиной образования экссудата среднего уха [2, 3, 7].

Известно, что иммуноглобулины представляют собой белки, обеспечивающие нейтрализацию токсинов, иммобилизацию бактерий, конденсацию микроорганизмов и антигенных частиц, преципитацию растворимых антигенов, а также фагоцитоз бактерий макрофагами, разрушение их цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Среди присутствующих в крови иммуноглобулинов (Ig) пяти классов – IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, иммуноглобулины G составляют 75% всех сывороточных иммуноглобулинов крови. Иммуноглобулины IgA составляют около 15% Ig и обычно локализируются в слизистых оболочках носоглотки, обеспечивая первичную защиту от местного воспаления. Иммуноглобулины IgM составляют около 10% сывороточных иммуноглобулинов и участвуют в большинстве гуморальных иммунных реакций [8].

Вирусная инфекция верхних дыхательных путей способна вызывать IgE-опосредованную реакцию, которая часто возникает в носоглотке, что может приводить к дисфункции евстахиевой трубы. Кроме того, прослеживается связь заболевания с герпесвирусом, в частности вирусом Эпштейна – Барр, который, действуя на лимфатическую систему организма, развивает или усугубляет иммунную недостаточность [5].

Результаты исследования Wenyan Fan et al. показали, что уровень IgE в сыворотке крови и в экссудате среднего уха в группе пациентов с ЭСО был достоверно выше, чем в контрольной. Это указывает на участие IgE в развитии ЭСО у детей [3]. Вполне вероятно, что аллергия играет существенную роль в развитии заболеваний среднего уха, и дети с атопией могут быть более восприимчивы к острому среднему отиту с экссудатом и без него [4, 5].

Витамин D (кальциферол) участвует в регуляции обмена кальция и фосфора в организме. Вместе с тем оказывает влияние на дифференцировку клеток и развитие иммунной системы. В ряде исследований сообщалось, что дефицит витамина D может повышать риск многочисленных острых/хронических оториноларингологических заболеваний, включая аллергический ринит, хронический риносинусит с полипами носа, рецидивирующий средний отит, острые респираторные инфекции и астму [9; 10, с. 600]. Наблюдалась связь дефицита витамина D с увеличением размеров миндалин и/или аденоидов и, таким образом, с развитием среднего отита. Витамин D участвует в регуляции тонзиллярных Т-клеток человека, и его дефицит может увеличивать риск формирования аденоидно-тонзиллярной гипертрофии из-за неадекватной регуляции иммунной системы. Рецепторы витамина D обнаружены также



на Т-клетках, В-клетках, антигенпрезентирующих клетках, макрофагах и дендритных клетках. Витамин D иммуномодулирует как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. В адаптивной иммунной системе витамин D ингибирует пролиферацию активированных лимфоцитов, снижает продукцию воспалительных цитокинов и способствует развитию индуцированных регуляторных Т-клеток. Недавние исследования показали, что низкий уровень витамина D является результатом, а не причиной воспалительного процесса у пациентов с рецидивирующей аденоидной гипертрофией на фоне бактериальной инфекции. [9].

В исследовании Haitham Alnori et al. (2020) была продемонстрирована связь между содержанием витамина D и проявлением иммунологической реакции: показано, что дефицит витамина D может привести к увеличению концентрации IgE и, следовательно, к усилению выраженности аллергической реакции у пациентов с аллергическим ринитом [11].

По данным ряда авторов, дефицит витамина D соответствует уровню его концентрации ниже 20 мкг/л (50 нмоль/л), недостаточность – 21 и 29 мкг/л (52,5–72,5 нмоль/л), нормальные значения концентрации составляют выше 30 мкг/л (>75 нмоль/л); для гипервитаминоза D характерна концентрация свыше 150 мкг/л (375 нмоль/л) [11, 12].

Согласно данным литературы, нормальные показатели гуморального иммунитета у детей 6–8 лет (2–5 лет) составляют: Ig A – 0,9–1,9 мг/л (0,3–1,5), Ig G – 9,7–11,7 мг/мл (8,8–15,4), Ig M – 0,8–1,9 мг/мл (0,8–1,6), Ig E – 0–100 мг/мл [13, с. 60]. В исследовании Rumeysa Olcaу Bayram et al. (2019) средние значения показателей гуморального иммунитета у детей 6–8 лет (3–5 лет) составили: Ig A – 1,06 г/л (0,69), IgM – 1,14 г/л (1,12), IgG – 8,11 г/л (8,39) [14].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сопоставительное исследование показателей клинико-лабораторных тестов, отражающих состояние местного и общего иммунитета, аллергии, содержания витамина D сыворотки крови, с проявлением особенностей морфологической картины слизистой оболочки носа детей с экссудативным средним отитом на этапе подготовки их к хирургическому лечению.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения концентрации IgA, IgG, IgM, IgE, витамина D в крови и морфологического состава материала слизистой полости носа (риноцитограммы) проведено исследование 50 человек, среди которых 30 пациентов с экссудативным средним отитом, средний возраст которых составил $5,74 \pm 2,91$ года: из них 18 мальчиков (50%); 12 девочек (40%), а также 20 практически здоровых детей (составивших группу сравнения), средний возраст которых составил $6,04 \pm 2,72$ года: 9 мальчиков (45%), 11 девочек (55%).

Диагноз «экссудативный средний отит» поставлен на основании данных анамнеза, жалоб пациента, осмотра (отоскопия, тимпанограмма, аудиометрия).

Критериями включения пациентов в исследования явились наличие экссудативного среднего отита и возраст пациентов 3–12 лет, а критерии исключения пациентов – патология со стороны иммунной системы (в том числе аллергические заболевания в анамнезе) и наличие онкологического заболевания.

Таблица 1
Референсные значения исследуемых показателей крови
Table 1
Reference values for studied blood count parameters

Исследуемые показатели	Средние референсные значения согласно данным производителей наборов реагентов		
IgA, г/л	0,63–4,84		
IgG, г/л	5,4–18,22		
IgM, г/л	0,22–2,93		
IgE, МЕ/мл	1–5 лет	6–9 лет	10–15 лет
	0–60	0–90	0–200
Витамин D, мкг/л	30–100		

Взятие материала и обзорная микроскопия риноцитограмм осуществлялись в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии». Определение концентраций IgA, IgG, IgM, IgE и витамина D проводилось в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр «Кардиология» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Определение концентрации IgA, IgG, IgM, IgE в сыворотке крови проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbott, США) с использованием соответствующих наборов реагентов фирмы Abbott, витамина D – на автоматическом иммунофлюоресцентном анализаторе miniVidas Blue (Biomeriox, Франция). В качестве референсных значений для оценки сдвигов показателей крови использованы данные производителя реагентов (Abbott; США), приведенные в табл. 1.

Окрашивание мазков слизистой оболочки полости носа с последующим исследованием риноцитограмм осуществлялось мануальным методом с использованием 96° этанола в качестве фиксатора и красителя азур – эозина по Романовскому.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием параметрических методов исследования, в том числе оценки достоверности (критерий Стьюдента). Выборочные параметры, приведенные в табл. 3, 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 №AXXR012E839529FA).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

При обследовании пациентов с экссудативным средним отитом обращали внимание на снижение слуха, заложенность и шум в ушах, «покалывания и щелчки». При отоскопии наблюдалось помутнение барабанной перепонки, инъецирование сосудами, укорочение светового рефлекса, наличие экссудата в барабанной полости, втяжение барабанной перепонки. На тимпанограмме выявлялся тип С или В. При аудиометрии – снижение слуха по смешанному и кондуктивному типу. Приведенные клинические признаки свидетельствовали о необходимости хирургического лечения.



Определены показатели концентрации IgA, IgG, IgM, IgE и витамина D в сыворотке крови детей с ЭСО, проходивших хирургическое лечение в РНПЦ оториноларингологии. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как следует из рассмотрения табл. 2, средние значения концентрации IgM в сыворотке крови статистически значимо не различаются и находятся в пределах известных референсных величин во всех исследуемых группах ($p>0,05$).

Концентрация IgA у пациентов с ЭСО статистически значимо снижена по сравнению со значениями показателей лабораторных тестов у пациентов группы сравнения (1,08 г/л и 2,30 г/л соответственно, $p<0,05$); концентрация IgG статистически значимо снижена по сравнению со значениями показателей лабораторных тестов

Таблица 2
Средние значения показателей гуморального иммунитета и витамина D в сыворотке крови пациентов исследуемых групп

Table 2
Average values of humoral immunity and serum vitamin D levels in studied groups' patients

Исследуемый показатель	Пациенты с ЭСО, n=30*	Группа сравнения (здоровые дети), n=20*	Статистическая значимость различий
	$m \pm \delta^{2*}$	$m \pm \delta^{2*}$	
IgA, г/л	1,08 $\pm$ 0,17**	2,30 $\pm$ 0,12	$p<0,05$
IgG, г/л	9,22 $\pm$ 0,70**	13,25 $\pm$ 1,82	$p<0,05$
IgM, г/л	1,07 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,25	$p>0,05$
IgE, г/л	85,01 $\pm$ 20,57**	37,44 $\pm$ 17,88	$p<0,05$
Витамин D, мкг/л	27,15 $\pm$ 3,54**	62,15 $\pm$ 4,28	$p<0,05$

Примечания: * n – количество пациентов; m – среднее значение; δ^2 – ошибка средней арифметической; ** статистически значимые различия с группой здоровых пациентов.

Таблица 3
Результаты исследования риноцитогрaмм

Table 3
Rhinocytograms results

Определяемый показатель	Пациенты с ЭСО, n=30, $m \pm \delta^{2*}$	Группа сравнения (здоровые дети), n=20, $m \pm \delta^{2*}$	Статистическая значимость различий
Эпителий мерцательный, в поле зрения $M \pm \delta^*$	3,23 $\pm$ 0,90	3,08 $\pm$ 0,81	$p>0,05$
Лейкоциты, в поле зрения $M \pm \delta^*$	11,3 $\pm$ 2,06**	4,4 $\pm$ 2,86	$p<0,05$
Нейтрофилы, % $M \pm \delta^*$	85,0 $\pm$ 1,92	88,0 $\pm$ 1,65	$p>0,05$
Лимфоциты, % $M \pm \delta^*$	2,8 $\pm$ 1,37	3,8 $\pm$ 1,87	$p>0,05$
Моноциты, % $M \pm \delta^*$	2,4 $\pm$ 0,98	2,3 $\pm$ 1,24	$p>0,05$
Эозинофилы, % $M \pm \delta^*$	9,35 $\pm$ 3,18**	2,87 $\pm$ 1,15	$p<0,05$

Примечания: * n – количество пациентов; m – среднее значение; δ^2 – ошибка средней арифметической; ** статистически значимые различия с группой здоровых пациентов.

у пациентов группы сравнения (9,22 г/л и 12,25 г/л соответственно, $p<0,05$), что может свидетельствовать о нарушении регуляции иммунной системы.

Концентрация IgE у пациентов с ЭСО статистически значимо увеличена (85,01 МЕ/мл) по сравнению с аналогичными значениями у представителей группы сравнения (37,44 МЕ/мл, $p<0,05$), что может указывать на роль аллергии в этиопатогенезе ЭСО.

Концентрация витамина D у пациентов с ЭСО статистически значимо снижена (27,15 мкг/л) по сравнению с соответствующими показателями группы здоровых детей (62,15 мкг/л, $p<0,05$), что не противоречит полученным данным средних уровней концентраций иммуноглобулинов, поскольку витамин D принимает участие в регуляции гуморального иммунитета.

Результаты обзорной микроскопии препаратов со слизистой носа здоровых детей и пациентов с экссудативным средним отитом представлены в табл. 3.

Из приведенных в табл. 3 данных следует, что процентное соотношение эозинофилов достоверно выше у пациентов с ЭСО ($p<0,05$). Это может быть связано с вовлечением аллергического фактора в этиопатогенез ЭСО.

■ ВЫВОДЫ

1. На этапе подготовки пациентов к хирургическому лечению концентрация IgA ($1,08\pm 0,17$ г/л) и IgG ($9,22\pm 0,70$ г/л) сыворотки крови детей с экссудативным средним отитом статистически достоверно ($p<0,05$) снижена по сравнению с показателями группы сравнения на 53% и 30,4% соответственно, тогда как концентрация IgE ($85,01\pm 20,57$ МЕ/мл), напротив, увеличена на 127% ($p<0,05$).
2. Концентрация витамина D у пациентов с экссудативным средним отитом статистически значимо снижена ($27,15\pm 3,54$ мкг/л) по сравнению с группой сравнения ($p<0,05$) и находится на нижней границе референсного интервала.
3. Процентное соотношение эозинофилов (9,35/100 лейкоцитов) и других клеточных элементов слизистой оболочки носа в риноцитограмме пациентов с экссудативным средним отитом статистически значимо увеличено по сравнению с аналогичными значениями у представителей группы сравнения ($p<0,05$).

Таким образом, у пациентов с экссудативным средним отитом имеет место нарушение состояния гуморального иммунитета, выражающееся в снижении концентрации витамина D, увеличении уровня иммуноглобулина E и процентного содержания эозинофилов в риноцитограмме по сравнению с аналогичными значениями у здоровых детей, что может свидетельствовать о влиянии аллергического компонента на формирование морфологических изменений в слизистой оболочке носа и о рецидивировании экссудативного среднего отита. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего поиска факторов риска формирования экссудата в барабанной полости и возможности осуществления медицинской профилактики при констатации лабораторных признаков гиповитаминоза D.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Christine L. Barron BS, Louie B. Kamel-Abusalha, Rishabh Sethia MD. Identification of essential biofilm proteins in middle ear fluids of otitis media with effusion patients. *Laryngoscope*, 2020; 130(3):806–811. doi: 10.1002/lary.28011.
2. Erol Keleş, Sinasi Yalçın. The role of allergy in the etiology of otitis media with effusion; immune system and cytokines. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 2004;13(3–4):51–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055981/> (accessed 2 May 2023)



3. Wenyan Fan, Xiaoyan Li. Relationship of T lymphocytes, cytokines, immunoglobulin E and nitric oxide with otitis media with effusion in children and their clinical significances. *Rev Assoc Med Bras*, 2019 Aug 5;65(7):971–976. doi: 10.1590/1806-9282.65.7.971.
4. Benjamin C. Pau, Daniel K. Ng Prevalence of otitis media with effusion in children with allergic rhinitis, a cross sectional study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2016 May, 84;156–160. doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.03.008
5. Krotov S. Features of the prolonged course of exudative otitis media. Literature review. *Otorhinolaryngology. Eastern Europe*, 2022;12(2):219–228. (in Russian)
6. Mashkova T.A., Maltsev A.B, Alkilani L.A. A blocker of leukotriene receptors in the complex treatment of exudative otitis means in patients with allergic rhinitis. *Modern problems of science and education*. 2021;3. doi: 10.17513/spno.30814. (in Russian)
7. James M. Parrish, Manasi Soni, Rahul Mittal. Subversion of host immune responses by otopathogens during otitis media. *J Leukoc Biol*. 2019 Oct;106(4):943–956. doi: 10.1002/JLB.4RU0119-003R
8. Su Young Jung, Dokyoung Kim, Dong Choon Park. Immunoglobulins and Transcription Factors in Otitis Media. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Mar;22(6):3201. doi: 10.3390/ijms22063201
9. Ji-Hyeon Shin, Byung-Guk Kim, Boo Young Kim. Is there an association between vitamin D deficiency and adenotonsillar hypertrophy in children with sleep-disordered breathing? *BMC Pediatr*. 2018 Jun 19;18(1):196. doi: 10.1186/s12887-018-1178-8.
10. Kamyshnikov V.S. (2018) *Methods of clinical laboratory research*. 9th edition, Moscow, 736. (In Russian)
11. Haitham Alnori, Fawaz Abdulghani Alassaf Vitamin D and Immunoglobulin E Status in Allergic Rhinitis Patients Compared to Healthy People. *J Med Life*. 2020 Oct-Dec;13(4):463–468. doi: 10.25122/jml-2020-0015
12. Rafiu Ariganjoye Pediatric Hypovitaminosis D. *Glob Pediatr Health*. 2017. doi: 10.1177/2333794X16685504
13. Ovsyannikov D.Yu., Kuzmenko L.G., Grishina T.I. (2022) *Fundamentals of clinical immunology and allergology of childhood: a textbook*. Moscow, 136 pp. (In Russian)
14. Rumeysa Olcay Bayram Reference ranges for serum immunoglobulin (IgG, IgA, and IgM) and IgG subclass levels in healthy children. *Turk J Med Sci*. 2019;49(2):497–505. doi: 10.3906/sag-1807-282.



Бруцкая-Стемпковская Е.В.✉, Шепелькевич А.П.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Первичный гиперпаратиреоз: методология скрининга и тактика клинико-лабораторного исследования пациентов групп риска

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Бруцкая-Стемпковская Е.В. – исполнитель исследования, автор рукописи; Шепелькевич А.П. – концепция, редакция рукописи.

Подана: 12.02.2024

Принята: 15.04.2024

Контакты: lenabs@tut.by

Резюме

В последние годы частота встречаемости (ЧВ) первичного гиперпаратиреоза (ПГПТ) во многих странах значительно увеличилась за счет внедрения скрининга гиперкальциемии. В Республике Беларусь ЧВ гиперкальциемии составила 2,6 на 100 человек, что свидетельствует о недостаточной экономической целесообразности внедрения популяционного скрининга гиперкальциемии. По результатам проведенного сплошного исследования кальциемии выявлено достоверное увеличение ЧВ гиперкальциемии в группе женщин в менопаузе в возрасте 51–70 лет (5,3 случая на 100 человек, $p=0,002$) и в группе пациентов с наличием ПГПТ-ассоциированных заболеваний (ЖКБ, МКБ, язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки, переломы в анамнезе, компоненты синдромов МЭН – 6,5 случая на 100 человек, $p<0,001$). Полученные данные позволили определить группы риска гиперкальциемии и ПГПТ, обосновать необходимость внедрения скрининга в этих группах пациентов. В статье описан обновленный пошаговый алгоритм лабораторной диагностики и дифференциальной диагностики ПГПТ.

Ключевые слова: гиперкальциемия, паратгормон, первичный гиперпаратиреоз, диагностика первичного гиперпаратиреоза, скрининг



Brutskaya-Stempkovskaya E.✉, Shepelkevich A.
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Primary Hyperparathyroidism: Screening Methodology and Clinical Laboratory Testing Tactics in Risk Group Patients

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Brutskaya-Stempkovskaya E. – study performing, manuscript drafting; Shepelkevich A. – study concept, manuscript editing.

Submitted: 12.02.2024

Accepted: 15.04.2024

Contacts: lenabs@tut.by

Abstract

Recently, the prevalence of hyperparathyroidism (PHPT) in many countries has increased due to hypercalcemia screening. The prevalence of hypercalcemia in Belarus is 2.6% and indicates insufficient economic feasibility of introducing the population hypercalcemia screening. According to our results, the hypercalcemia prevalence is significantly increased in menopausal women aged 51–70 years (5.3%, $p=0.002$) and in patients with PHPT-associated diseases (cholelithiasis, nephrolithiasis, stomach peptic ulcer, duodenal ulcer, fractures history, and MEN syndromes components (6.5%), $p<0.001$). The data obtained allowed to determine the risk groups for hypercalcemia and PHPT and to substantiate the necessity of implementing hypercalcemia screening in these groups of patients. An updated step-by-step algorithm for PHPT laboratory diagnosis and differential diagnosis is presented.

Keywords: hypercalcemia, parathyroid hormone, primary hyperparathyroidism, diagnosis of primary hyperparathyroidism, screening

■ ВВЕДЕНИЕ

Первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ) представляет собой клинко-лабораторный симптомокомплекс, развивающийся в результате гиперпродукции паратиреоидного гормона (ПТГ) патологически измененными паращитовидными железами (ПЩЖ) и проявляющийся синдромом гиперкальциемии и полиорганными нарушениями различной степени выраженности.

Спорадические формы ПГПТ встречаются в 90% случаев заболевания, обусловлены гиперплазией, аденомой или раком ПЩЖ. До 10% случаев ПГПТ развивается на основе имеющихся генетических мутаций (патология кальций-чувствительного рецептора, синдромы множественных эндокринных неоплазий (МЭН) первого типа, 2А и 2Б типов). Частота встречаемости (ЧВ) наследственных форм выше у лиц молодого возраста [1–4].

Медицинская и социальная значимость ПГПТ определяется развитием мультисистемных осложнений, которые обуславливают потерю трудоспособности, рост инвалидности и смертности [1, 4–6].

За последние десятилетия научный и практический интерес к проблеме ПГПТ значительно увеличился. Опубликованы результаты работы четырех международных рабочих групп по изучению ПГПТ, в 2018 году стартовала новая программа Европейского общества эндокринологов PARAT, направленная на изучение заболеваний ПЩЖ, в том числе ПГПТ [7–9].

По результатам полученных данных сведения о ЧВ заболевания, его патогенезе, клинических проявлениях и дифференциальной диагностике претерпели изменения, что требует оптимизации подходов к диагностике и лечению [7–9].

В Республике Беларусь в 2018 году был разработан и внедрен в практическое здравоохранение алгоритм диагностики ПГПТ, основанный на скрининге гиперкальциемии в группах риска [4].

■ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ПГПТ

Эпидемиология ПГПТ в разных странах характеризуется значительной вариативностью в зависимости от особенностей национальной стратегии в диагностике ПГПТ и внедрения скрининга гиперкальциемии. За последнее столетие ЧВ ПГПТ в США и странах Западной Европы значительно увеличилась с 0,007% до 0,2–1% в общей популяции, у женщин в менопаузе – до 2% [2, 7, 9]. В Республике Беларусь, по данным эпидемиологического исследования, проведенного в г. Минске в 2015 году, ЧВ ПГПТ в общей популяции составила 1,2%, у женщин в возрасте 51–70 лет – 3,4% [6, 9–11]. В то же время, по данным официальной статистики, общая зарегистрированная заболеваемость ПГПТ в 2014 году составила 0,00155 на 100 человек [6], что свидетельствует о недостаточном внимании к проблеме ПГПТ и большом количестве невыявленных пациентов.

Структура ПГПТ в последние десятилетия также значительно трансформировалась: от первоначально классического симптомокомплекса паратиреоидной остеодистрофии до преобладания мягких форм заболевания (75–85%) в странах с внедренным скринингом гиперкальциемии [2, 4, 7]. В странах, где отсутствуют национальные программы по скринингу, в том числе в Республике Беларусь, до настоящего времени в общей структуре ПГПТ превалируют манифестные формы [2, 4, 7, 9], сопровождающиеся множественными осложнениями.

■ КЛАССИФИКАЦИЯ ПГПТ

По степени выраженности клинических проявлений выделяют мягкие и манифестные формы ПГПТ (рис. 1).

Наиболее распространенным является гиперкальциемический вариант ПГПТ с тенденцией к росту мягких форм заболевания.

Основной проблемой лечения и наблюдения за пациентами с мягкими формами ПГПТ является отсутствие значимых предикторов прогрессирования заболевания, что требует длительного их мониторингования для своевременного проведения хирургического лечения.

Причины нормокальциемического ПГПТ:

- 1) дефицит витамина D (содержание витамина D общего в сыворотке крови менее 20 нг/мл (мкг/л)) [9, 12];
- 2) хроническая болезнь почек со снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ);

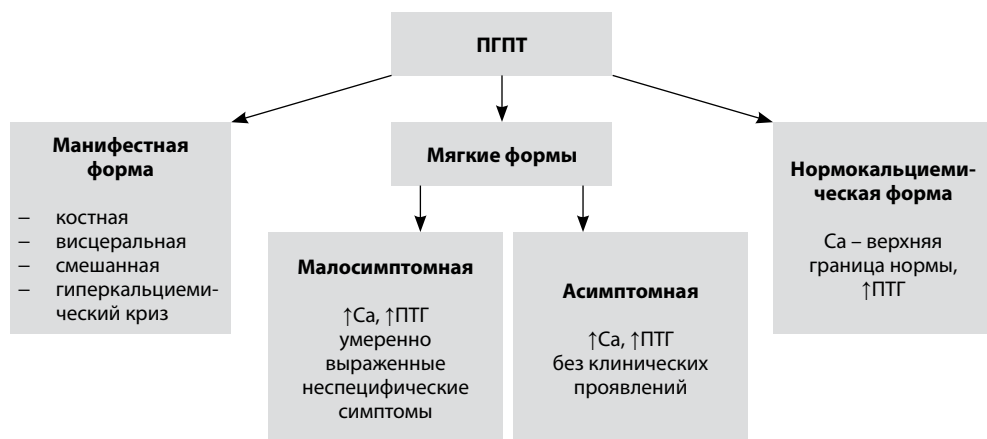


Рис. 1. Клинические формы ПГПТ
Fig. 1. Clinical forms of PTHrP

- 3) нарушение всасывания кальция в кишечнике, синдром мальабсорбции;
- 4) рак ПЩЖ;
- 5) начальная стадия ПГПТ.

В настоящее время наметилась тенденция к гипердиагностике нормокальциемического варианта ПГПТ, что связано с наличием сложностей в понимании и проведении дифференциальной диагностики этой клинической формы заболевания [7, 8].

■ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПГПТ

В основе клинических проявлений заболевания лежат синдромы гиперкальциемии и гипофосфатемии, индуцированные хронически повышенным содержанием ПТГ в крови.

Синдром гиперкальциемии проявляется поражением костной ткани, почек, желудочно-кишечного тракта, нервной и сердечно-сосудистой систем, снижением массы тела и образованием кальцинатов в тканях и органах [10, 13–15].

Синдром гипофосфатемии характеризуется развитием миопатий, парестезий, судорог, полиурии, гиповолемии, жажды, ускорением разрушения форменных элементов крови [6].

Клинические проявления и осложнения ПГПТ зависят от скорости развития заболевания, возраста пациентов, а также от уровня гиперкальциемии.

Повышенный уровень кальция сыворотки является независимым предиктором, ассоциированным с увеличением смертности в общей популяции [6, 10, 11, 15], в связи с чем в ряде стран исследование кальциемии включено в протокол стандартного биохимического исследования крови.

■ ДИАГНОСТИКА ПГПТ

Диагностика ПГПТ основана на выявлении гиперкальциемии, которая является диагностическим лабораторным маркером заболевания [7, 10], как при наличии

клинических симптомов, так и в случае мягких форм ПГПТ, и сопровождается повышенным или высоконормальным содержанием ПТГ в сыворотке крови.

Раннее выявление гиперкальциемии целесообразно как для ранней диагностики ПГПТ, так и для своевременного выявления злокачественных опухолей и костных метастазов, лейкозов, миеломной болезни, лимфом, лимфогранулематоза, вторичного гиперпаратиреоза, синдромов множественных эндокринных неоплазий, саркоидоза [10, 16].

ЧВ гиперкальциемии в разных популяциях варьирует от 0,17 до 3,9 случая на 100 человек в зависимости от расовых, половых, популяционных особенностей, а также от используемого алгоритма диагностики и внедрения скрининга гиперкальциемии [2, 10, 11, 14, 15]. До 90% всех случаев гиперкальциемии приходится на ПГПТ, обусловленный злокачественными новообразованиями [15].

Для оценки целесообразности внедрения популяционного скрининга гиперкальциемии в Республике Беларусь было проведено сплошное исследование кальциемии у взрослого населения г. Минска с участием 1207 человек в возрасте от 18 до 96 лет (892 женщины и 315 мужчин, средний возраст $53,9 \pm 17,25$ года). Биохимическое исследование сыворотки крови при проведении сплошного исследования кальциемии осуществлялось на базе клинико-диагностической лаборатории УЗ «Минский консультационно-диагностический центр» с использованием многоканального биохимического автоматического анализатора AU-400 производства Olympus (Япония, 2008). Исследование содержания общего кальция выполнялось арсенальным методом с применением реагентов производства Beckman-Coulter (США).

По результатам исследования частота встречаемости гиперкальциемии составила 2,6 случая на 100 человек [6, 10, 13], в связи с чем внедрение популяционного скрининга гиперкальциемии у взрослого населения страны признано экономически нецелесообразным.

В то же время было установлено, что ЧВ гиперкальциемии у женщин в менопаузе в возрастной группе 51–70 лет достоверно увеличивается и составляет 5,3 случая на 100 человек ($\chi^2=9,61$; $p=0,002$), частота встречаемости ПГПТ у женщин в возрастной группе 51–70 лет составила $3,4 \pm 0,94$ на 100 человек, что достоверно выше, чем в общей популяции – $1,2 \pm 0,32$ случая на 100 обследованных ($\chi^2=8,05$; $p=0,005$). Внедрение скрининга гиперкальциемии у женщин данной возрастной группы целесообразно для раннего выявления ПГПТ и других ассоциированных заболеваний.

При анализе гиперкальциемии у пациентов с наличием хотя бы одного заболевания, ассоциированного с ПГПТ (ЖКБ, МКБ, язвенная болезнь желудка и (или) 12-перстной кишки, низкотравматические переломы, компоненты синдромов МЭН), ЧВ гиперкальциемии составила 6,5 случая на 100 человек, что достоверно выше, чем в общей популяции ($\chi^2=17,51$; $p<0,001$) [6].

Полученные результаты позволили сформировать группы риска с достоверно повышенной ЧВ гиперкальциемии и ПГПТ ($p<0,001$) по сравнению с аналогичными результатами в общей популяции населения, что оказывается весьма важным для проведения экономически обоснованного скрининга, и разработать алгоритм диагностики ПГПТ, который включает 4 этапа (рис. 2) [4, 5].

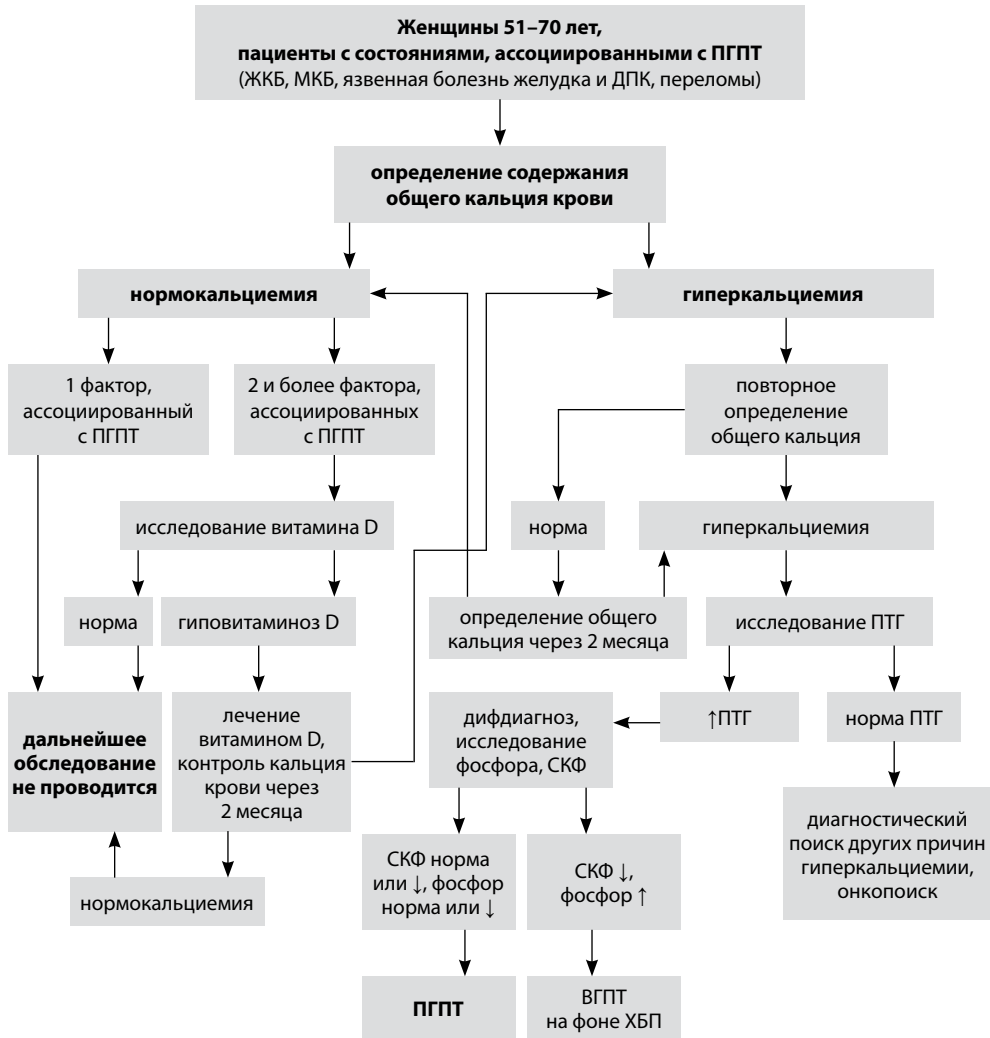


Рис. 2. Алгоритм диагностики ПГПТ
Fig. 2. Algorithm for PHPT diagnostics

I этап – оценка наличия факторов риска ПГПТ

В группу повышенного риска ПГПТ вошли женщины в менопаузе в возрастной группе 51–70 лет, а также пациенты любого пола и возраста, имеющие в анамнезе ПГПТ-ассоциированные состояния:

- ЖКБ;
- МКБ;
- язвенная болезнь желудка и (или) 12-перстной кишки;
- низкотравматические переломы;
- заболевания, являющиеся компонентами синдромов МЭН.

При наличии одного и более из указанных факторов пациент относится к группе риска развития ПГПТ и подлежит обследованию врачами всех специальностей в соответствии с разработанным алгоритмом.

II этап – скрининг кальциемии в группах риска

Всем пациентам группы риска развития ПГПТ проводится исследование кальциемии.

Для осуществления рутинного популяционного скринингового исследования применяется определение общего кальция в сыворотке крови [2, 7, 15, 16] фотометрическим методом. Простота его проведения, невысокая себестоимость и возможность использования при комплексных биохимических исследованиях крови с помощью современной полуавтоматической и полностью автоматизированной аппаратуры послужили обоснованием его выбора для использования в амбулаторных условиях. При этом было учтено, что кальций стабилен в сыворотке крови в течение 24 часов при комнатной температуре (18–25 °C), что снижает требования к транспортировке и техническому оснащению лаборатории [13–17], что облегчает использование в амбулаторной практике.

В то же время следует учитывать, что наибольшей физиологической активностью в сыворотке крови обладает ионизированный кальций. Фракция ионизированного кальция в крови наиболее стабильна, его доля в составе общего кальция может изменяться при патологических состояниях, сопровождающихся изменениями в содержании белковых фракций или pH крови. Однако такие пациенты, как правило, находятся в тяжелом соматическом состоянии и в амбулаторной практике встречаются редко. В таких особых случаях рекомендуется оценивать ионизированный кальций [10, 14–16].

Ионизированный кальций определяется на основе ионселективных технологий посредством специальных кальциевых электродов [16], что требует отдельного забора крови и наличия специального анализатора. Эта технология исследований обладает относительно высокой стоимостью и используется преимущественно в лабораториях, обеспечивающих деятельность отделений интенсивной терапии и реанимации.

Ионизированный кальций, определенный расчетным методом по уровню альбумина, не всегда соответствует истинному его содержанию в крови и соответствует термину «кальций, скорректированный по альбумину».

Таким образом, в амбулаторных условиях для скрининга гиперкальциемии целесообразно определение общего кальция в сыворотке крови. Для повышения достоверности полученных результатов необходимо соблюдать требования к преаналитическому этапу исследования: отменить по возможности лекарственные средства, влияющие на уровень кальциемии, исключить длительное наложение жгута на область предплечья при взятии крови на исследование, похлопывание по руке с целью улучшения визуализации вен.

При анализе полученных результатов следует исключать транзиторную физиологическую гиперкальциемию у взрослых после приема пищи, физиологическую гиперкальциемию у новорожденных после 4 суток жизни, терапию лекарственными средствами, влияющими на уровень кальциемии.

Важно иметь в виду, что лекарственными средствами, способствующими повышению уровня кальциемии, являются тиазидные диуретики, антациды, андрогены,



соли кальция, витамины D и A, прогестерон, этакриновая кислота, соли лития, теофиллин, а лекарственными средствами, способствующими снижению уровня кальциемии (маскирующими гиперкальциемию), – петлевые диуретики, бисфосфонаты, аминогликозиды, барбитураты, карбамазепин, соли магния, деносумаб, цинакальцет [16].

При отсутствии повышенных и верхненормальных значений содержания кальция в сыворотке крови в ходе проведения первичного исследования пациентов с наличием только одного ПГПТ-ассоциированного фактора или женщин в менопаузе в возрастной группе 51–70 лет без ПГПТ-ассоциированных факторов дальнейшее обследование не проводится.

Повторное определение кальциемии. При впервые выявленной гиперкальциемии и при регистрации верхненормальных значений содержания кальция в сыворотке крови проводится повторное определение общего кальция одновременно с определением альбумина сыворотки крови для расчета содержания кальция, скорректированного по альбумину (для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов), по формуле [4, 6]:

$$\text{Корректированный Ca} = \text{общ Ca (ммоль/л)} + 0,02 (40 - \text{альбумин [г/л]}).$$

При наличии изменений содержания плазменных белков (альбумин крови менее 40 г/л или более 45 г/л) корректировка уровня общего кальция крови по альбумину должна проводиться обязательно. Таким пациентам целесообразно проводить определение ионизированного кальция прямым методом.

При повторном выявлении гиперкальциемии необходимо оценить содержание ПТГ в плазме или сыворотке крови (III этап).

При выявлении гиперкальциемии в ходе первичного исследования и отсутствии в повторном исследовании следует исключить факторы, влияющие на содержание кальция в крови. Контроль кальциемии проводится через 2 месяца.

При наличии 2 и более ПГПТ-ассоциированных факторов в сочетании с нормальным уровнем кальция общего и (или) ионизированного необходимо определить содержание витамина D для исключения нормокальциемической формы ПГПТ на фоне его дефицита [4, 8, 12, 18].

При отсутствии дефицита витамина D (витамин D общий более 20 нг/мл (мкг/л)) у пациента с наличием 2 и более ПГПТ-ассоциированных факторов в сочетании с двукратным нормальным уровнем кальция общего и/или ионизированного кальция дальнейшее исследование не проводится.

При выявлении дефицита витамина D проводится лечение назначением витамина D в дозе 2000 МЕ в сутки с последующей титрацией дозы до достижения содержания витамина D общего в сыворотке крови более 30 нг/мл (мкг/л) с повторным определением кальция общего через 1–2 месяца.

Контроль содержания общего кальция через 1 месяц на фоне лечения лекарственными средствами витамина D необходимо проводить пациентам с изначально тяжелым дефицитом витамина D (менее 10 нг/мл (мкг/л)) с нарушением функции почек и пациентам, получающим сопутствующее лечение тиазидными диуретиками, во избежание развития тяжелой гиперкальциемии.

При изначально тяжелом дефиците витамина D (менее 10 нг/мл (мкг/л)) на фоне снижения СКФ <30 мл/мин/1,73 м² и отсутствии эффекта при лечении нативными

формами витамина D более двух месяцев для ускорения достижения целевого содержания витамина D может использоваться кальцитриол в дозе 0,25 мкг/сут с контролем кальция общего через 2–4 недели.

При выявлении гиперкальциемии на фоне адекватной терапии препаратами витамина D выполняется исследование ПТГ (III этап).

При выявлении нормокальциемии на фоне ликвидации дефицита витамина D дальнейшее обследование не проводится.

При наличии 2 и более ПГПТ-ассоциированных факторов в сочетании с верхненормальными или сомнительными уровнями общего и (или) ионизированного кальция целесообразно проводить исследование ПТГ (III этап) для исключения нормокальциемического ПГПТ, не связанного с дефицитом витамина D.

Критерии степени тяжести гиперкальциемии, оцениваемые по уровню кальция общего или скорректированного по альбумину:

- легкая – до 3,0 ммоль/л;
- умеренная – 3,0–3,5 ммоль/л;
- тяжелая – более 3,5 ммоль/л.

Критерии степени тяжести гиперкальциемии, оцениваемые по уровню кальция ионизированного:

- легкая – до 2,0 ммоль/л;
- умеренная – 2,0–2,5 ммоль/л;
- тяжелая – более 2,5 ммоль/л.

III этап – определение содержания ПТГ

При подтвержденной гиперкальциемии проводится определение ПТГ в плазме или сыворотке крови.

Особенности преаналитического этапа. Молекула ПТГ является нестойким соединением, при хранении образца при комнатной температуре содержание гормона в исследуемом образце значительно снижается, что является причиной диагностических ошибок, в связи с чем незамороженная сыворотка должна быть доставлена в лабораторию и исследована только в день взятия биологического материала. При отсутствии такой возможности необходимо быстрое замораживание материала при –20 °С для исключения распада ПТГ в пробе.

Транспортировка биологического материала в лабораторию исследования обеспечивается в термоконтейнерах с соблюдением температурных условий хранения: +2 – +8 °С в случае доставки в день получения биоматериала или при –20 °С в случае доставки замороженной сыворотки или плазмы. Нагревание или оттаивание биологического материала не допускается.

Для обеспечения достоверности результатов исследования ПТГ (исключения влияния временного и температурных факторов на результаты исследования) целесообразно проводить взятие крови в медицинском учреждении, осуществляющем исследование ПТГ.

Интерпретация результатов исследования ПТГ. Выявление повышенного уровня ПТГ одновременно с увеличением концентрации общего и/или ионизированного кальция сыворотки является достоверным лабораторным критерием для подтверждения диагноза ПГПТ.



Выявление верхненормального уровня ПТГ (на верхней границе референтного интервала, но не выходящего за его пределы) при наличии гиперкальциемии также может подтверждать наличие ПГПТ.

IV этап – дифференциальная диагностика

Проведение диагностического поиска только на основании данных биохимического и гормонального исследования не позволяет в 100% случаев оценить причину возникновения гиперкальциемии и гиперпаратиреоза.

Проведение паратиреоидэктомии в условиях неполного дифференциально-диагностического поиска приводит к рецидивам патологического процесса, разочарованию пациентов и отказу от дальнейшего обследования и лечения.

Для подтверждения первичного поражения ПЩЖ с целью исключения других нозологических форм, сопровождающихся увеличением ПТГ и гиперкальциемией, проводится определение СКФ, неорганического фосфата крови, витамина D сыворотки крови и оценка экскреции кальция с мочой.

При подозрении на малосимптомный ПГПТ при удовлетворительной функции почек (СКФ >60 мл/мин/1,73 м²) для дифференциальной диагностики рекомендуется оценка экскреции кальция с мочой (определение суточной экскреции кальция с мочой или содержания кальция и креатинина в суточной моче с расчетом соотношения «кальций/креатинин»). Выявление резко сниженной почечной экскреции кальция (суточная экскреция кальция с мочой <5 ммоль/24 ч, <100 мг/24 ч или изменение соотношения «кальций/креатинин» $<0,01$) на фоне гиперкальциемии в сочетании с повышенным или «высоконормальным» уровнем ПТГ является диагностическим критерием семейной доброкачественной гипокальциурической гиперкальциемии (СГГ).

СГГ – это генетически детерминированное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, обусловленное дефектом кальций-чувствительных рецепторов в ПЩЖ и в почках, которые воспринимают нормальный уровень кальциемии как пониженный. В результате секретируется избыток ПТГ, почки усиленно реабсорбируют кальций, что приводит к выраженному снижению соотношения «кальций/креатинин».

При ПГПТ клиренс кальция по креатинину оказывается обычно выше 0,02, но снижение соотношения «кальций/креатинин» может наблюдаться и при ПГПТ у пациентов, ограничивающих потребление кальция.

При снижении СКФ менее 60 мл/мин/1,73 м² диагностическая ценность определения соотношения клиренс кальция / клиренс креатинина снижается.

При СГГ гиперкальциемия развивается в молодом возрасте, для СГГ не характерны: МКБ, ЖКБ, язва желудка и 12-перстной кишки, остеопороз; типично наличие семейного анамнеза заболевания. В сомнительных случаях рекомендуется генетическое тестирование самой распространенной формы СГГ – мутации гена CASR (встречается у 65% пациентов с СГГ). При этом у 35% пациентов с СГГ не выявляются CASR-мутации.

Во всех сомнительных случаях дифференциальной диагностики СГГ/ПГПТ оптимальной тактикой является динамическое наблюдение с оценкой экскреции кальция с мочой. При выявлении у пациента с подозрением на СГГ эпизодов нормальной экскреции кальция с мочой диагноз СГГ должен быть исключен. Предварительные диагностические сведения можно получить при обследовании родственников

пациента: выявление семейных случаев снижения экскреции кальция с мочой в сочетании с гиперкальциемией свидетельствует в пользу СГГ. Для СГГ характерно доброкачественное течение гиперкальциемии, при необходимости проводится консервативное лечение.

Недостаточное внимание к дифференциальной диагностике ПГПТ/СГГ приводит к ложной диагностике ПГПТ. Ошибочное проведение паратиреоидэктомии пациентам с СГГ ведет к послеоперационному рецидиву гиперкальциемии.

Существенные сложности возникают при диагностике случаев первично-множественного поражения ПЩЖ, которое не имеет специфических клинических и морфологических признаков и является одной из причин рецидива заболевания после паратиреоидэктомии. Первично-множественное поражение ПЩЖ при ПГПТ чаще встречается при гиперплазии ПЩЖ (до 80% случаев), что может являться поводом для увеличения периода наблюдения за пациентами с мягкими формами заболевания перед проведением паратиреоидэктомии.

Во всех случаях выявления ПГПТ у лиц молодого возраста (менее 45 лет) целесообразно исключать наследственные формы заболевания. В рамках наследственных синдромов ПГПТ регистрируется при МЭН-1 (до 90% случаев), МЭН-2а (50%), МЭН-2б (менее 5%) [3, 4].

ПГПТ часто является первым проявлением МЭН-1 и развивается до присоединения других компонентов синдрома, что определяет высокую значимость своевременной диагностики МЭН-1-ассоциированного ПГПТ. Для МЭН-1-ассоциированного ПГПТ характерны:

- более молодой возраст манифестации;
- множественный характер поражения ПЩЖ с возможным метахронным развитием образований;
- мягкое течение ПГПТ (низкие уровни интактного ПТГ и кальция крови);
- гиперплазия ПЩЖ;
- рецидивы ПГПТ после паратиреоидэктомии;
- отягощенный семейный анамнез.

Несмотря на имеющиеся клинические критерии постановки диагноза синдрома МЭН-1, самым надежным вариантом диагностики в настоящее время остается генетическое исследование [3].

Дифференциальная диагностика нормокальциемического ПГПТ проводится с вторичным гиперпаратиреозом, для которого характерны снижение СКФ, увеличение содержания неорганического фосфата крови, дефицит витамина D, признаки нарушения всасывания. Следует помнить, что во всех случаях, кроме начального периода ПГПТ и рака ПЩЖ, нормокальциемический ПГПТ характеризуется наличием клинических симптомов ПГПТ и является диагнозом исключения.

Дифференциальная диагностика ПГПТ, обусловленного раком ПЩЖ, должна проводиться всем пациентам с умеренной и тяжелой гиперкальциемией (кальций общий >3 ммоль/л, кальций ионизированный $>1,6$ ммоль/л), увеличением линейных размеров ПЩЖ >3 см, симптомами объемного образования шеи, а также в случаях нормокальциемического ПГПТ, не имеющего других обоснованных причин [7].

При постановке клинического диагноза учитывают: нозологию, форму с учетом степени выраженности клинических проявлений. При подтверждении диагноза ПГПТ для определения тактики лечения пациент направляется к врачу-эндокринологу [6].



Дополнительные диагностические исследования направлены на выявление осложнений ПГПТ и включают следующие: ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости, двойная рентгеновская абсорбциометрия дистального отдела предплечья недоминантной руки, поясничного отдела позвоночника и проксимального отдела бедра; LVA (VFA) – по показаниям, фиброгастродуоденоскопия по показаниям, расчет СКФ, исследование гликемии, липидного статуса, витамина D, состояния сердечно-сосудистой системы, генетические исследования по показаниям, анализ семейного анамнеза [1, 8].

Проведение топической диагностики ПГПТ целесообразно при планировании паратиреоидэктомии. Алгоритм топической диагностики ПГПТ предусматривает в качестве метода первого выбора УЗИ органов шеи. При невозможности верификации патологически измененных ПЩЖ с помощью УЗИ показано применение других методов визуализации: скинтиграфии с $^{99}\text{Tc-MIBI}$, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, мультиспиральной компьютерной томографии с контрастированием, 4D-компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, позитронно-эмиссионной томографии [1, 8].

Рутинное использование тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии ПЩЖ не включено в алгоритм обследования пациентов с ПГПТ, поскольку не имеет высокой диагностической значимости.

Дифференциальная диагностика гиперкальциемии, не сопровождающейся увеличением ПТГ. При выявлении нормальной или сниженной концентрации ПТГ проводят диагностический поиск по выявлению других причин гиперкальциемии (паранеопластическая гиперкальциемия, миеломная болезнь, гранулематозы, молочно-щелочной синдром, болезнь Педжета, хроническая надпочечниковая недостаточность, метафизарная хондродисплазия Янсена) [4].

При выявлении других причин гиперкальциемии пациент направляется к профильному врачу-специалисту.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее эффективной стратегией предупреждения формирования и прогрессирования осложнений ПГПТ являются его своевременная диагностика и лечение. Основой ранней диагностики ПГПТ является скрининг кальциемии у пациентов из групп риска (наличие одного и более ПГПТ-ассоциированных факторов, женщины в возрасте 51–70 лет). Разработанный поэтапный четырехэтапный алгоритм диагностики ПГПТ включает сбор анамнеза и обследование пациента с целью выявления ПГПТ-ассоциированных состояний и включения его в группу риска, двукратное исследование кальциемии у пациентов из групп риска, исследование ПТГ и дифференциально-диагностический поиск, что позволяет улучшить диагностику заболевания и оптимизировать себестоимость обследования.

Особое значение имеют соблюдение требований к преаналитическому этапу лабораторных исследований и тщательный анализ полученных результатов с учетом анамнестических данных, что позволяет избежать системных диагностических ошибок при оценке содержания кальция и ПТГ.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Clinical protocol "Diagnostics and treatment of patients with endocrine diseases of the pituitary gland, adrenal glands, gonads (adult population)". Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus 21.06.2021 № 85. (in Russian)
2. Yeh M.W. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. *The J. of Clinical Endocrinology a. Metabolism*. 2013;98(3):1122–1129.
3. Mokrysheva N.G., Eremkina A.K., Miliutina A.P., Salimkhanov R.Kh., Aboishava L.A., Bibik E.E., Gorbacheva A.M., Elfimova A.R., Kovaleva E.V., Popov S.V., Melnichenko G.A. Predicting the presence of MEN1 gene mutation based on the clinical phenotype of patients with primary hyperparathyroidism. *Problems of endocrinology*. 2023;69(5):4–15. (in Russian)
4. Shepelkevich A.P., Mokhort T.V., Belyaev S.A., Karlovich N.V., Brutsкая-Stempkovskaya E.V. Algorithm for diagnosing primary hyperparathyroidism: instructions for use No. 109-10-2018: approved by the Ministry of Health of the Republic Belarus 30.11.2018. Minsk, 2018; 13 p. (in Russian)
5. Tran T. Persistence of excess mortality following individual non-hip fractures: a relative survival analysis. *The J. of Clinical Endocrinology a. Metabolism*. 2018;103(9):3205–3214.
6. Brutsкая-Stempkovskaya E.V. Characteristics of bone manifestations of primary hyperparathyroidism in postmenopausal women, rationale for early diagnosis of the disease (PhD Thesis). Minsk, BSMU, 2019. (in Russian)
7. Bilezikian J.P. Hyperparathyroidism. *Lancet*. 2018;391:168–178.
8. Bollerslev J. Unmet therapeutic, educational and scientific needs in parathyroid disorders: Consensus Statement from the first European Society of Endocrinology Workshop (PARAT). *European Journal of Endocrinology*. 2019;181:1–19.
9. Press D.M. The prevalence of undiagnosed and unrecognized primary hyperparathyroidism: a population-based analysis from the electronic medical record. *Surgery*. 2013;154(6):1232–1238.
10. Brutsкая-Stempkovskaya E.V., Shepelkevich A.P., Kostin G.M., Chertko E.N. Prevalence of hypercalcemia in adult population of Minsk-city. *Lechdelo*. 2017;2:35–40. (in Russian)
11. Shepelkevich A.P., Brutsкая-Stempkovskaya E.V., Kostin G.M., Losik M.V., Chertko E.N. Prevalence of hypercalcemia in adult population of Minsk: clinical outcomes. The results of the continuous study. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2018;7(3):321–332. (in Russian)
12. Battista C. Vitamin D status in primary hyperparathyroidism: effect of genetic background. *Endocrine*. 2017;55(1):266–272.
13. Instruction Calcium Arsenazo Reagent Set. Beckman-Coulter. USA. 2015:1–2.
14. Gastanaga V. Prevalence of hypercalcemia of malignancy in the United States. Projection methods using oncology electronic health records. *Europ. J. of Cancer*. 2013;49:302–303.
15. Minisola S. The diagnosis and management of hypercalcaemia [Electronic resource]. *The BMJ*. 2015;350. Available at: <http://www.bmj.com/content/bmj/350/bmj.h2723.full.pdf>. (accessed 23.04.2019).
16. Kamyshnikov V.S. (ed.) *Methods of clinical laboratory research*. 5th ed. M.: MEDpress-inform. 2011; 751 p. (in Russian)
17. On approval of the Instructions on the procedure for organizing the preanalytical stage of laboratory tests [Electronic resource]: order of the Ministry of Health of the Republic. Belarus, 10 Nov. 2015, No. 1123. ConsultantPlus. Belarus. LLC "YurSpectr", National. information center Rep. Belarus. Minsk, 2019. (in Russian)
18. Viccica G. Impact of vitamin D deficiency on the clinical and biochemical phenotype in women with sporadic primary hyperparathyroidism. *Endocrine*. 2017;55(1):256–265.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.2.008>



Hussein B.J.✉, Ghani B.A.
University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Effect of Local Application of Collagen and Beta-Tricalcium Phosphate on Bone Healing

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Hussein B.J. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft; Ghani B.A. – supervision, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft.

Ethics statement. This work approved by Dentistry at the University of Baghdad. The experiment was conducted in accordance with the ethical principle for animal experiments of the College of Dentistry at the University of Baghdad (No. 429721). The article is published in the author's edition.

Submitted: 25.08.2023

Accepted: 29.03.2024

Contacts: medicalresearch68@yahoo.com

Abstract

Introduction. The healing of bone tissue, whether a fracture or fusion, is influenced by a number of biochemical, biomechanical, cellular, hormonal and other pathogenetic mechanisms associated with the regulation of phosphorus-calcium metabolism. β -Tricalcium phosphate (β -TCP) is a bioceramic material that represents a good balance among absorption, degradation and new bone formation and can preserve structural stability by releasing a large quantity of calcium (Ca^{2+}) and sulfate (SO_4^{2-}) ions, which are indispensable inorganic salts for new bone formation. Collagen (COL) is the major component in numerous tissues and can be extracted as a natural biomaterial for various medical and biological purposes.

Purpose. To evaluate the individual and combined effects of β -TCP and COL sponges on bone healing.

Materials and methods. A total of 20 adult male albino rats with average weights of 250–350 g (3–4 months) were used in this study. Four intrabony holes were induced in both femurs of each rat and filled with β -TCP, COL, and their combination in the experimental groups. The fourth group of holes, which were left to heal spontaneously, was used as the control. Sacrification of animals was performed after 2- and 4-week healing periods to prepare specimens for histological and histomorphometric analyses.

Results. Histological findings showed that the combined application of β -TCP and COL resulted in more bone formation and mineralization compared with the other groups. Highly significant differences regarding bone cells and bone marrow area were recorded among all groups for during both healing periods.

Conclusion. The combined application of β -TCP and COL was more effective in enhancing bone formation and maturation compared with the controls.

Keywords: beta-tricalcium phosphate, collagen, bone healing, mineralization, osteogenic cells, intrabony holes

Хусейн Б.Дж.✉, Гхани Б.А.
Университет Багдада, Багдад, Ирак

Влияние местного применения коллагена и бета-трикальцийфосфата на заживление повреждений костной ткани

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Хусейн Б.Дж. – концепция, методология, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, анализ полученных результатов, написание исходного текста статьи; Гхани Б.А. – научное руководство, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, анализ полученных результатов, написание исходного текста статьи.

Этическое заявление. Данная работа одобрена Стоматологическим колледжем Университета Багдада. Эксперимент проводился в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными Стоматологического колледжа Университета Багдада (№ 429721).

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 25.08.2023

Принята: 29.03.2024

Контакты: medicalresearch68@yahoo.com

Резюме

Введение. На заживляемость костной ткани, будь то перелом или сращение, влияет целый ряд биохимических, биомеханических, клеточных, гормональных и других патогенетических механизмов, связанных с регуляцией фосфорно-кальциевого обмена. β -трикальцийфосфат (β -TCP) – это биокерамический материал, обеспечивающий оптимальный баланс между абсорбцией, разрушением и образованием новой костной ткани, который способен сохранять структурную стабильность за счет высвобождения большого количества ионов кальция (Ca^{2+}) и сульфата (SO_4^{2-}), представляющих собой неорганические соли, необходимые для формирования новой костной ткани. Коллаген (COL) является основным компонентом многих тканей и может быть использован в качестве природного биоматериала для различных медицинских и биологических целей.

Цель. Оценка влияния β -TCP и коллагеновых губок на заживление кости при отдельном и комбинированном применении.

Материалы и методы. В исследовании использовали 20 взрослых крыс-самцов – альбиносов со средним весом 250–350 г (3–4 месяца). В обеих бедренных костях каждой крысы было проделано по четыре внутрикостных отверстия, которые заполнили β -TCP, COL и их комбинацией (экспериментальные группы). В четвертой группе отверстия были оставлены для спонтанного заживления (контрольная группа). По истечении 2- и 4-недельных периодов восстановления животных умерщвляли и отбирали образцы для гистологического и гистоморфометрического анализа.

Результаты. Выполненное гистологическое исследование позволило установить, что комбинированное применение β -TCP и коллагена способствует более активному формированию и минерализации костной ткани по сравнению с результатами, полученными в других группах. Выраженные достоверно значимые различия в количестве костных клеток и площади костного мозга были зафиксированы во всех группах в течение обоих периодов восстановления.



Заключение. Комбинированное применение β -TCP и коллагена способствует более эффективному формированию и развитию костной ткани по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: бета-трикальцийфосфат, коллаген, заживление костной ткани, минерализация, остеогенные клетки, внутрикостные отверстия

■ INTRODUCTION

Bone is a dynamic biological tissue mainly composed of three components: cells, fibers, and matrix. Collagen (COL), which provides tensile strength, is the main component of the bone matrix. Calcium phosphate, which provides compressive strength, is the main mineral component of bone [1]. In the treatment of bone defects, scaffolds play an important role and can provide a bridge for new bone tissue growth into the gap and a platform for cells and growth factors to exert their physiological roles [2].

β -Tricalcium phosphate (β -TCP) is a calcium salt of phosphoric acid with the chemical formula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. This compound is also known as tribasic calcium phosphate; calcium phosphate is one of the main combustion products of bones. Calcium phosphate is also commonly derived from inorganic sources such as mineral rock [3]. β -TCP is a promising biomaterial for bone repair due to its osteoconductivity, osteoinductivity, biodegradation, and delivery of large amounts of calcium and phosphate ions into the defect environment. β -TCP is favored by maxillofacial and orthopedic surgeons in the restoration of bone tissue loss [4].

β -TCP is reabsorbed in a progressive manner, which leaves an area for bone neoformation. Multiple studies have been conducted on β -TCP and bone interaction, and histological examination showed initial bone neoformation in intergranular areas and porous surfaces, which guided new bone formation. Unlike hydroxyapatite, β -TCP is continuously and totally reabsorbed, which results in the discharge of calcium and phosphate ions that actively participate in new osseous tissue formation [5].

The critical geometry of β -TCP, in addition to its macro- and microporous structures, can result in the successful trapping of ions, osteogenic cells, and osteogenic proteins, which provides a suitable microenvironment for osteoinduction. In particular, the provision of calcium and phosphate ions by the dissolution of soluble β -TCP can contribute to a favorable environment for bone formation [6].

β -TCP is employed in the medical and dental fields and numerous dental operations, including pulp capping, apexification in endodontics, restoration of cleft palates and orbital rim deformities in maxillofacial surgery, and repair of osseous lesions in periodontics [7].

COL is a biological macromolecule and a key structural protein, the principal component of connective tissues in animals, and the most widely distributed functional extracellular matrix protein [8]. COL has been used for decades as scaffolding material in bone tissue engineering approaches where autografts are not feasible. Polymeric COL can be easily processed in a number of ways to manufacture biomaterials in the form of sponges, particles, or hydrogels for different applications [9]. When used as a scaffolding material, COL not only acts as a physical support for cells to attach to and grow on but also influences cell behavior; type I COL-based biomaterials are suitable and biocompatible in promoting successful bone healing when implanted into bone defects [10].

COL-based biomaterials (i) are biocompatible, (ii) have a tunable degradation rate, (iii) elicit a mild inflammatory response, (iv) are invaded by the host cells, and (v) can become vascularized. These features have made COL progressively popular for the enhanced healing processes [11]. In addition, COL stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. Different strategies have been tested to increase the vascularization of COL-based biomaterials and cell proliferation and enhance osteogenic differentiation [12].

COL has been widely used in clinical settings for a number of years and exhibits good biodegradability, biocompatibility, and absorbability [13]; it is close to the natural organic structure of bone and exerts positive effects on cell fate. COL can also facilitate cell attachment and can be easily absorbed by organisms. Moreover, COL can inhibit the growth of bacterial pathogens [14].

A COL sponge is a biocompatible material that fills the extraction socket and acts as a scaffold to prevent the collapse of soft tissue after extraction. In conclusion, it can reduce the patient's postoperative complications at an early stage, enhance the initial healing of soft tissue, and minimize periodontal defects [15].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To evaluate the individual and combined effects of β -TCP and COL sponges on bone healing.

■ MATERIALS AND METHODS

Study design and setting

Twenty adult male albino rats weighing approximately 250–350 g and aged 3–4 months were used in this study. The rats received intramuscular injection of 50 mg ketamine hydrochloride (1 mL/kg body weight) plus 2% xylazine (0.2 mL/kg body weight). Surgery was performed under sterile conditions by making an incision on the skin and underlying fascia. Then, reflection was performed to expose the rat femurs. Induction of four intrabony holes approximately 3 mm in depth and 2 mm in width was conducted with intermittent drilling and continuous cooling with normal saline using a micro engine that was set at a rotary speed of 2500 rpm. The operation sites were washed with normal saline to remove debris. Group A (20 holes), as the control group, was left untreated for spontaneous healing. The intrabony holes in Groups B (20 holes), C (20 holes), and D (20 holes) were filled with COL, β -TCP material, and combined COL and β -TCP materials, respectively.

Animals

All animals were scarified after 2 and 4 weeks of healing, and bone specimens were immediately fixed in 10% freshly prepared formalin and left for 2 days for fixation. Bone decalcification was performed using a formic acid sodium citrate solution, which was freshly prepared from two solutions (125 cc formic acid (90%) and 125 cc distilled water; 50 mg sodium citrate and 250 cc distilled water) [16] and the specimens were processed into paraffin blocks. Tissue sections of 5 μ m thickness were prepared followed by hematoxylin and eosin staining and histological examination using a light microscope (OpticaB-350, Italy).



Histomorphometric analysis of the following bone microarchitectures was performed. Bone cell counting involved the following:

1. Osteoblast (OB) cell number (OB/mm²).
2. Osteocyte cell number (OC/mm²).
3. Osteoclast cell number (OCL/mm²).

Trabecular and bone marrow areas were also measured:

1. Trabecular area (mm²).
2. Bone marrow area (mm²).
3. Trabecular number (mm²).

Statistics

Measurement of trabecular and bone marrow area was performed using a program software (ImageJ.exe). The recorded data were analyzed statistically by analysis of variance and least significant difference test.

■ RESULTS

Histological findings

After 2 weeks of healing, the microphotography of bone sections from Group A (control group) showed new trabeculae rimmed by OBs, osteocytes embedded in bone, and osteoclasts (Figure 1). Group B (COL group) exhibited deposition of new bone trabeculae enclosing the marrow tissue rimmed by OBs (Figure 2). Group C (β -TCP group) revealed osteocytes embedded in newly formed bone and osteoclasts (Figure 3). Group D (COL + β -TCP group) presented new bone trabeculae rimmed by OBs and osteocytes embedded in the bone (Figure 4).

Four-week duration of bone healing

Histological examination of bone sections from Group A (control group) showed dense bone and Haversian canals surrounded by osteocytes (Figure 5). Group B (COL group) exhibited newly formed bone that was more densely rimmed by OBs and osteocytes in (Figure 6). The microphotograph view of Group C (β -TCP group) after 4 weeks of healing

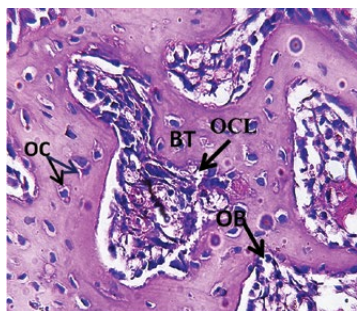


Fig. 1. After 2 weeks of healing, the control group showed new bone trabeculae (BT), osteocytes (OCs) osteoblasts (OB), and osteoclasts (OCL). H&EX 40

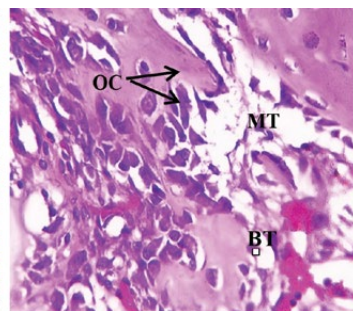


Fig. 2. After 2 weeks of healing the collagen group showed thin bone trabeculae (BT), marrow tissue (MT), and osteocytes (OC). H&EX40

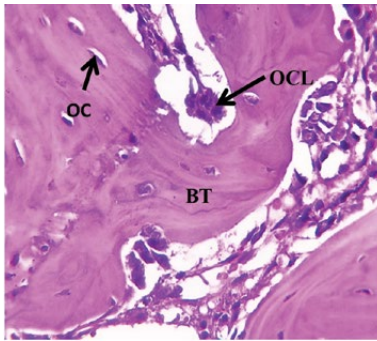


Fig. 3. After 2 weeks of healing, the β -TCP group showed bone trabeculae (BT), osteocytes (OC), and osteoclasts (OCL). $\times 40$

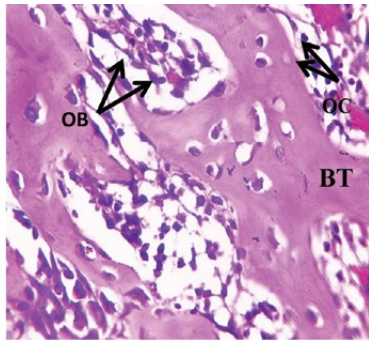


Fig. 4. After 2 weeks of healing, the β -TCP + collagen group showed new bone trabeculae (BT), osteoblasts (OB), and osteocytes (OC). $\times 40$

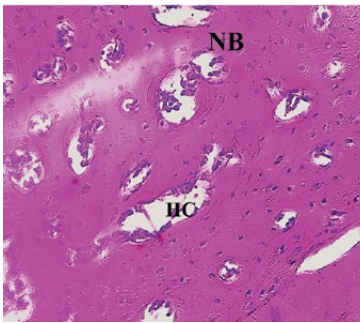


Fig. 5. The control group showed new bone (NB) and Haversian canal (HC) after 4 weeks of healing. H&E $\times 20$

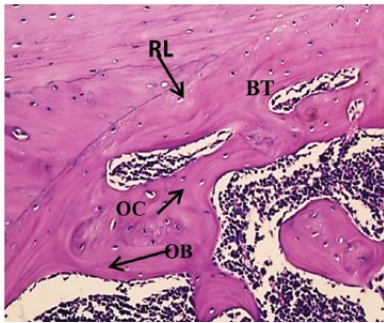


Fig. 6. After 4 weeks of healing, the collagen group revealed dense bone trabeculae (BT), osteoblast (OB), osteocytes (OC), and reversal line (RL). H&E $\times 20$

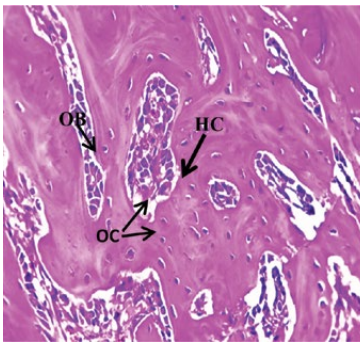


Fig. 7. After 4 weeks of healing, the TCP group exhibited thick bone trabeculae (BT) with regularly arranged osteocytes (OC) and osteoblasts (OB). H&E $\times 20$

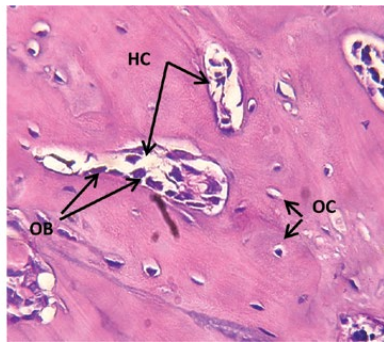


Fig. 8. After 4 weeks of healing, the combined treatment group showed Haversian canal (HC), osteocytes (OC), and osteoblast (OB) cells. H&E $\times 40$

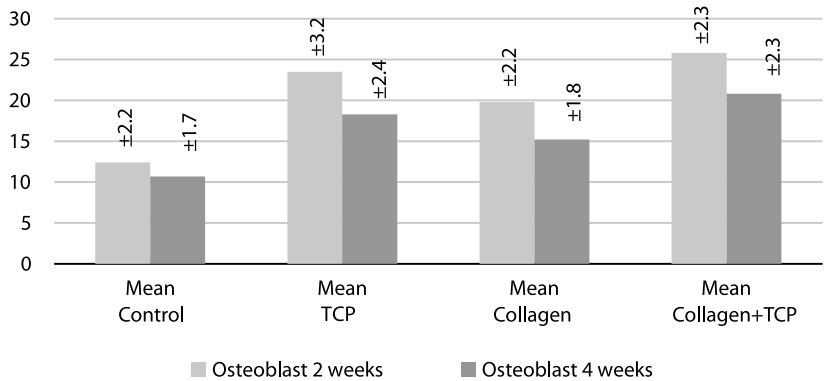


Fig. 9. Bar chart representation of the mean and standard deviation of bone cells after 2- and 4-week healing intervals for OBs in the control, COL, β -TCP, and COL + β -TCP groups

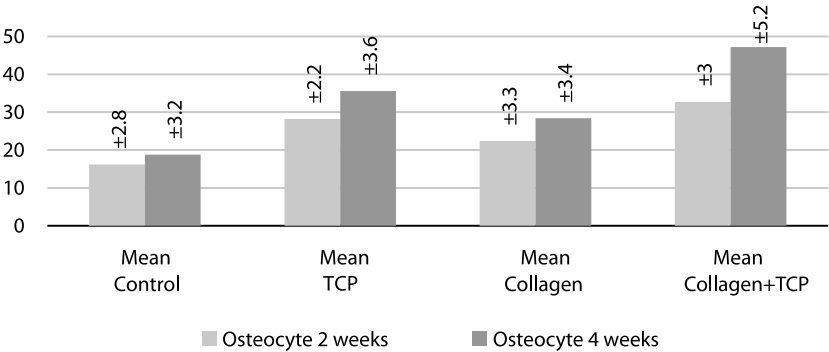


Fig. 10. Bar chart representation of the mean and standard deviation of bone cells after 2- and 4-week healing intervals for osteocytes in the control, COL, β -TCP, and COL + β -TCP groups

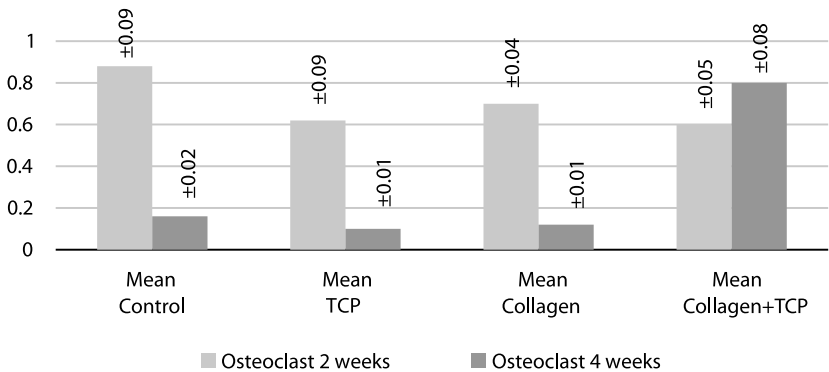


Fig. 11. Bar chart representation of the mean and standard deviation of bone cells after 2- and 4-week healing intervals for osteoclasts in the control, COL, β -TCP, and COL + β -TCP groups

revealed dense bone trabeculae with Haversian canals and osteocytes (Figure 7). After 4 weeks of healing, bone sections in Group D (COL + β -TCP group) presented dense bones with Haversian canals lined by OBs and surrounded by osteocytes (Figure 8).

Table 1
Comparison of bone cells in different healing durations in all studied groups

Variable	Duration	Control		COL		β -TCP		COL + β -TCP	
		T test	P value	T test	P value	T test	P value	T test	P value
OB	Between 2 and 4 weeks	1.734	0.110	4.987	0.010*	5.855	0.000**	5.414	0.000**
Osteocyte	Between 2 and 4 weeks	-3.129	0.042*	-6.326	0.000**	-7.897	0.000**	-15.788	0.000**
Osteoclast	Between 2 and 4 weeks	35.477	0.000**	30.911	0.000**	25.023	0.000**	-19.383	0.000**

Notes: * significant result; ** highly significant result.

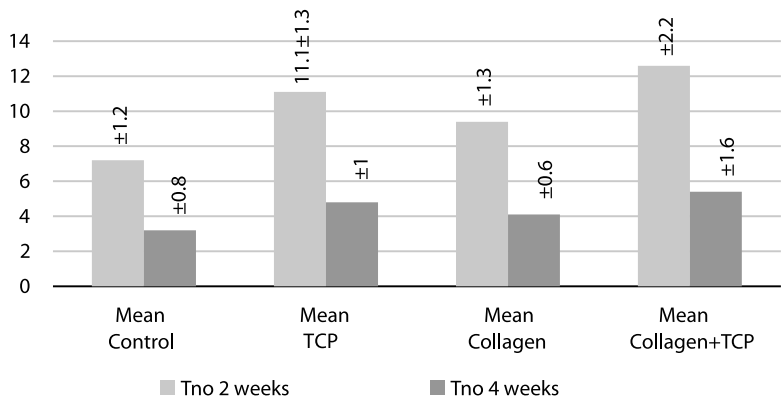


Fig. 12. Barchart representation of the mean and standard deviation of TN in bone cells after 2- and 4-week healing intervals

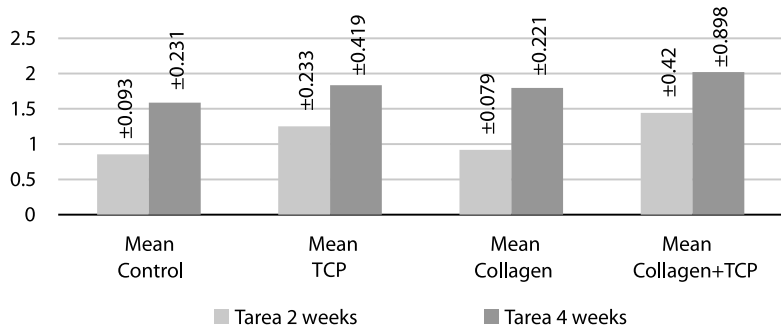


Fig. 13. Bar chart representation of the mean and standard deviation of bone cells in the T area after 2- and 4-week healing intervals

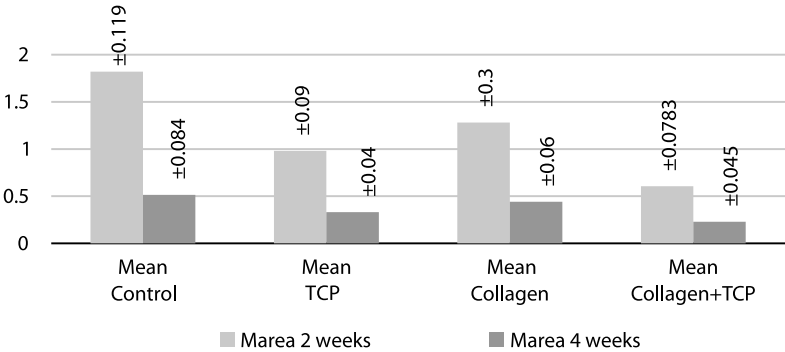


Fig. 14. Bar chart representation of the mean and standard deviation of BMA in bone cells after 2- and 4-week healing intervals

Table 2
Healing duration comparison for TN, TA, and BMA in all studied groups

Variable	Duration	Control		β-TCP		COL		COL + β-TCP	
		T test	P value	T test	P value	T test	P value	T test	P value
TN	Between 2 and 4 weeks	4.112	0.019*	6.275	0.000**	5.798	0.000**	7.109	0.000**
TA	Between 2 and 4 weeks	−18.363	0.000**	−31.119	0.000**	−38.313	0.000*	−27.707	0.000**
BMA	Between 2 and 4 weeks	30.118	0.000*	28.997	0.000**	40.947	0.000**	33.309	0.000**

Notes: * significant result; ** highly significant result.

Histomorphometric analysis of bone architecture parameters

Comparison of bone cells in all studied groups using paired T test showed a highly significant difference ($P<0.01$) between 2 and 4 weeks of healing periods (Figures 9, 10, and 11 and Table 1).

With the use of paired T test, comparison of TN, TA, and BMA in all studied groups showed highly significant results ($P<0.01$) between 2 and 4 weeks of healing, except for TN in the control group (Figures 12, 13, and 14 and Table 2).

■ **DISCUSSION**

The bone healing process is indicated by the deposition of bone matrix and the creation of trabecular bone, which decreases in number but grows in thickness throughout the healing process. The amount of newly formed bone in osseous defects is one of the most critical elements in determining the degree of bone regeneration [17]. These reported findings are in line with the results of this study, as illustrated by histological examination of bone sections, which showed newly formed trabeculae rimmed by OBs that decreased in number as they thickened over time. This finding was more evident in the experimental groups, specifically the combined treatment group.

Rico et al. (2021) [18] used COL powder in a rabbit alveolar cleft model and observed considerably improved bone repair. COL acted as a scaffold on which cells were retained and induced to differentiate, which increased osteogenesis. In line with this study, the COL group mostly showed increased OB differentiation and reduced osteoclastogenesis through the inhibition of osteoclast activity from 2 weeks to 4 weeks. This finding is supported by that of Dawood and AL-Ghaban (2021) [19], who demonstrated that bone defects treated with marina COL exhibited new bone formation in the form of numerous bone trabeculae, which suggests the role of COL in providing an osteoconductive environment for the migration, proliferation, and differentiation of bone-forming cells. The effect of β -TCP application on bone healing revealed an increased number of OBs, which agrees with the finding of Gilev et al. (2020) [20], who augmented the tibia of New Zealand rabbits with β -TCP alone and revealed β -TCP as an optimal material for inducing OB differentiation, mineralization of the extracellular matrix, and subsequent bone formation.

Moreover, the recorded mean values of TN and TA were higher in the β -TCP groups than in the control group, which is in agreement with the result of Lu et al. (2021) [21], who implanted β -TCP in femur defects in rabbits and observed that β -TCP affected bone repair by interacting with the surrounding tissues through the regulation of growth factors, cytokines, and ions. A possible mechanism of β -TCP-regulated osteogenesis is that β -TCP can directly or indirectly (via the release of ionic components, such as Ca^{2+} and PO_4^{3-}) facilitate OB differentiation, promote vascularization, regulate the release of growth factors, and alter blood clot formation, which promote bone healing at defect sites.

The combination group showed a high count of OB cells after 2 weeks of healing compared with the control group and more bone trabecular areas than in any of the other groups. This result agrees with that of Tebyanian et al. (2019) [22], who showed that the introduction of β -TCP powder into the COL matrix improved vascularization and the biological and mechanical properties of the COL scaffold and evaluated the effects of a complex COL/ β -TCP scaffold on bone formation in rabbit calvarial bone defects to assess the potential use of COL/ β -TCP as a bone substitute to repair bone defects.

In this study, the trabecular area thicknesses increased compared with that of the control group after 4 weeks, which is in agreement with the finding of Kim et al. (2017) [23], who concluded that the combined use of COL and β -TCP in the long bone fracture led to improved bone regeneration. Xiao (2015) [24] stated that the composition of the bone scaffold must be kept similar to that of natural bone to provide a desirable environment for cell attachment and proliferation. COL and β -TCP can mimic the basic composition of bone and have been used as bone graft substitutes. The results of this study are also consistent with those of Mohseni et al. (2018) [25], who showed the positive effect of nanocomposite β -TCP/COL scaffold in comparison with hydroxyapatite scaffold in the healing of femoral defects in rabbits; they also observed the improved quantity and velocity of bone formation and quantity of newly formed lamellae in the healing site of the nanocomposite TCP/COL group.

The results of the current study are also supported by those of Ho et al. (2016) [26], who combined β -TCP-COL into the tooth socket of beagle dogs and observed that the horizontal dimensions of alveolar bone were more evident in the β -TCP COL groups and accompanied by new bone formation at 4 weeks compared with those in the COL and control groups. This finding was obtained possibly because COL/ β -TCP simultaneously



acted as osteoinductive carrier and osteoconductive bone grafting material to accelerate bone regeneration.

CONCLUSION

Bone defects treated with COL/ β -TCP as a combination scaffold increased the rate of bone regeneration by enhancing OB proliferation and decreasing osteoclast activity and mineralization of the bone matrix was superior to that of the control group.

REFERENCES

1. Wei S., Ma J.X., Xu L., Gu X.S., Ma X.L. Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Med Res.* 2020;54(7). <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00280-6>
2. O'brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today.* 2011;14(3):88–95.
3. Kang H.J., Makkar P., Padalhin A.R., Lee G.H., Im S.B., Lee B.T. Comparative study on biodegradation and biocompatibility of multichannel calcium phosphate based bone substitutes. *Materials Science and Engineering: C.* 2020;110:110694.
4. Almashhadi Z.A., AL-Ghaban N.M. Histological and immunohistochemical evaluation of transforming growth factor- β 3 on bone healing treated by combination of chitosan and beta-tricalcium phosphate in rabbits. University of Baghdad, Mcs thesis. 2022:27.
5. Razouki N.A., Jamil B.A. Histological Evaluation of Effect of Combined Local Application of Vitamin D3 and Beta-Tricalcium Phosphate on Bone Formation in Rabbits. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology.* 2021;15(4):347.
6. Saito H., Shiau H.J., Prasad H., Reynolds M.A. Evaluation of a poly (lactic-co-glycolic) acid-coated β -tricalcium phosphate bone substitute for alveolar ridge preservation: case series. *Clinical advances in periodontics.* 2017;7(4):190–4.
7. Kim Y.K., An Y.Z., Cha J.K., Lee J.S., Jung U.W., Choi S.H. Combined effects of a chemically cross-linked porcine collagen membrane and highly soluble biphasic calcium phosphate on localized bone regeneration.
8. Rico-Llanos G.A., Borrego-González S., Moncayo-Donoso M., Becerra J., Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers.* 2021;13(4):599.
9. Wang T., Yang L., Wang G., Han L., Chen K., Liu P., Xu S., Li D., Xie Z., Mo X., Wang L. Biocompatibility, hemostatic properties, and wound healing evaluation of tilapia skin collagen sponges. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 2021;36(1):44–58.
10. Klimek K., Ginalska G. Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications – A review. *Polymers.* 2020;12(4):844.
11. Amirrah I.N., Lokanathan Y., Zulkiflee I., Wee M.M., Motta A., Fauzi M.B. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: From biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines.* 2022;10(9):2307.
12. Rather H.A., Patel R., Yadav U.C., Vasita R. Dual drug-delivering polycaprolactone-collagen scaffold to induce early osteogenic differentiation and coupled angiogenesis. *Biomedical Materials.* 2020;15(4):045008.
13. Matsuno T., Nakamura T., Kuremoto K.I., Notazawa S., Nakahara T., Hashimoto Y., Satoh T., Shimizu Y. Development of β -tricalcium phosphate/collagen sponge composite for bone regeneration. *Dental materials journal.* 2006;25(1):138–44.
14. Kim J.W., Seong T.W., Cho S., Kim S.J. Randomized controlled trial on the effectiveness of absorbable collagen sponge after extraction of impacted mandibular third molar: split-mouth design. *BMC Oral Health.* 2020;20:1–9.
15. Wang T., Li Q., Zhang G.F., Zhou G., Yu X., Zhang J., Wang X.M., Tang Z.H. Comparative evaluation of a biomimic collagen/hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate scaffold in alveolar ridge preservation with Bio-Oss Collagen. *Frontiers of Materials Science.* 2016;10:122–33.
16. Baban D.A., Omer R.M., Mohyadeen S.E. Effects of oral supplementation of pomegranate peel extract on some serum biochemical parameters related with bone in rabbit. *Journal of Baghdad College of Dentistry.* 2019;31(1):19–24.
17. Pepelassi E., Perrea D., Dontas I., Ulm C., Vrotsos I., Tangl S. Porous titanium granules in comparison with autogenous bone graft in femoral osseous defects: a histomorphometric study of bone regeneration and osseointegration in rabbits. *BioMed Research International.* 2019, Article ID 8105351, 12 pages.
18. Rico-Llanos G.A., Borrego-González S., Moncayo-Donoso M., Becerra J., Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers.* 2021;13(4):599.
19. Dawood A.S., AL-Ghaban N.M. Histological and Immunohistochemical study of the Effect of Local Application of Moringa Oleifera/Marine Collagen on Bone Healing in Rats. Baghdad University. Mcs, thesis. 2021:92.
20. Gilev M.V., Volokitina E.A., Antropova I.P. Bone remodeling markers after experimental augmentation of trabecular bone defects with resorbable and non-resorbable osteoplastic materials in rabbits. *Genij Ortopedii.* 2020;26:222–227.
21. Lu H., Zhou Y., Ma Y., Xiao L., Ji W., Zhang Y., Wang X. Current application of beta-tricalcium phosphate in bone repair and its mechanism to regulate osteogenesis. *Frontiers in Materials.* 2021;8:698915.
22. Tebyanian H., Norahan M.H., Eyni H., Movahedin M., Mortazavi S.J., Karami A., Nourani M.R., Baheiraei N. Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. *Journal of applied biomaterials & functional materials.* 2019;17(1):2280800018820490.
23. Kim K.H., Park J.Y., Park H.S., Kim K.S., Chin D.K., Cho Y.E., Kuh S.U. The influences of different ratios of biphasic calcium phosphate and collagen augmentation on posterior lumbar spinal fusion in rat model. *Yonsei Medical Journal.* 2017;58(2):407–14.
24. Xiao Y., Yin Q., Wang L., Bao C. Macro-porous calcium phosphate scaffold with collagen and growth factors for periodontal bone regeneration in dogs. *Ceramics International.* 2015;41(1):995–1003.
25. Mohseni M., Jahandideh A., Abedi G., Akbarzadeh A., Hesarak S. Assessment of tricalcium phosphate/collagen (TCP/collagene) nanocomposite scaffold compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology.* 2018;46(2):242–9.
26. Ho K.N., Salamanca E., Chang K.C., Shih T.C., Chang Y.C., Huang H.M., Teng N.C., Lin C.T., Feng S.W., Chang W.J. A novel HA/ β -TCP-collagen composite enhanced new bone formation for dental extraction socket preservation in beagle dogs. *Materials.* 2016;9(3):191.



Heal H.H.¹✉, Al-Dallee Z.T.¹, Khadam E.J.²

¹ University of Basrah, Basrah, Iraq

² University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Antibacterial and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles with Luteolin: Technology of Their Synthesis and Characteristics

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Heal H.H. – conceptualization, methodology, investigation, resources, data curation, writing – original draft, soft wire; Al-Dallee Z.T. – supervision, conceptualization, methodology, formal analysis, investigation; Khadam E.J. – supervision, conceptualization, methodology, writing – original draft.

The article is published in the author's edition.

Submitted: 02.09.2023

Accepted: 22.04.2024

Contacts: medicalresearch77@yahoo.com

Abstract

Introduction. Every industry, including health, nutrition, and energy, has been revolutionized by the advent of nanoparticles (NPs). There are several advantages to using nanotechnology in medicine, particularly for medication delivery. In order to create diverse metal nanocomposites with antibacterial and anticancer capabilities, green metal nanoparticle synthesis has been shown to be an efficient and environmentally friendly method.

Purpose. Synthesis luteolin silver nanoparticles (LuAgNPs) then characterization, test antibacterial and cytotoxicity.

Materials and methods. Luteolin used as reducing agent for synthesis LuAgNPs after addition to agno3 solution then undergo characterization. The antibacterial properties of LuAgNPs against gram bacteria (+) and gram (–) bacteria are studied. The cytotoxic effect of LuAgNPs and luteolin was also studied using the Microculture tetrazolium assays (MTT) assay method against cell lines MCF-7.

Results. Best parameter for LuAgNPs synthesis was PH=7, T=70 °. It has been shown that LuAgNPs have more antibacterial effect for gram-negative bacteria than gram positive bacteria. Luteolin silver nanoparticles showed high cytotoxic activity for luteolin silver nanoparticles than for luteolin.

Conclusion. Luteolin silver nanoparticles shows promising antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Luteolin silver nanoparticles have significant anticancer activity.

Keywords: anticancer activity, nanostructure, X-ray diffraction (XRD), microculture tetrazolium assays, green metal nanoparticle



Хеаль Х.Х.¹✉, Аль-Далли З.Т.¹, Хадам Э.Дж.²

¹ Университет Басры, Басра, Ирак

² Университет Багдада, Багдад, Ирак

Антибактериальные и цитотоксические свойства наночастиц серебра с лютеолином: технология их синтеза и характеристика

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Хеаль Х.Х. – концепция, методология, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, написание исходного текста статьи, программное обеспечение; Аль-Далли З.Т. – научное руководство, концепция, методология, анализ данных, проведение исследований; Хадам Э.Дж. – научное руководство, концепция, методология, написание исходного текста статьи.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 02.09.2023

Принята: 22.04.2024

Контакты: medicalresearch77@yahoo.com

Резюме

Введение. Наночастицы (НЧ) произвели революцию во всех отраслях экономики, включая здравоохранение, производство продуктов питания и энергетику. Использование нанотехнологий в медицине, в частности для доставки лекарственных препаратов, имеет ряд преимуществ. Для создания разнообразных нанокompозитных соединений металлов с антибактериальными и противораковыми свойствами был разработан эффективный и экологически чистый метод «зеленого» синтеза наночастиц металлов.

Цель. Синтез наночастиц серебра с лютеолином (LuAgNPs), их характеристики, исследование антибактериальных и цитотоксических свойств.

Материалы и методы. Лютеолин использовали в качестве восстанавливающего агента при синтезе LuAgNPs после добавления к раствору AgNO_3 , затем анализировали характеристики полученного вещества. Исследованы антибактериальные свойства LuAgNPs в отношении грамположительных (+) и грамотрицательных (–) бактерий. Кроме того, определено цитотоксическое действие LuAgNPs и лютеолина на клеточной линии MCF-7 с помощью микрокультурного тетразолиевого теста (МТТ).

Результаты. Оптимальными условиями для синтеза LuAgNPs были $\text{pH}=7$ и $t=70^\circ\text{C}$. Установлено, что LuAgNPs обладают более выраженным антибактериальным действием в отношении грамотрицательных бактерий, чем в отношении грамположительных. Наночастицы серебра с лютеолином проявляли более выраженную цитотоксическую активность к наночастицам серебра с лютеолином, чем к лютеолину.

Заключение. Определение антибактериальной активности наночастиц серебра с лютеолином в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий представляется весьма перспективным, тем более что наночастицы серебра с лютеолином демонстрируют выраженную противоопухолевую активность.

Ключевые слова: противоопухолевая активность, наноструктура, рентгеновская дифракция (XRD), микрокультурный тетразолиевый тест, «зеленая» металлическая наночастица

■ INTRODUCTION

Nanotechnology is a growing field and can be utilized to build tiny structures [1]. The Greek term for dwarf is the source of the word "nano", which refers to one billionth of substance [2]. It is one of the sectors of biotechnology that is developing and has a wide range of applications [3]. The ability to discern between different types of nanoscale compounds creates a variety of applications as well as prospects for new scientific study [4]. Pharmaceuticals tailored medication delivery methods, inhibitory agents for biofilm development, are just a few of the businesses that nanoparticle employ it [5].

AgNPs are useful as antibacterial agents, medication delivery vehicles, and physical therapy tools in the medical profession They may cause DNA damage, cytokine production, cell death through apoptosis, oxidative stress, and mitochondrial membrane changes [6]. Antibacterial nanoparticles are primarily used in the medical industry to create dressings, coatings, and systems for drug because they provide a solution to the increasing antibiotic resistance of bacteria [7]. Silver nanoparticles (AgNPs) are recently shown to have stronger antibacterial properties than basic silver [8] green synthesis which focuses on the development of cleaner, lower-temperature procedures and the use of natural extracts, especially those packed with polyphenolic substance – emerged with the help of environmentally friendly techniques. The aromatic benzene rings in the polyphenolic product have their hydroxyl (-OH) groups swapped out. These hydroxyl groups aid in the reduction of reactive metallic ions, including Ag (silver) ions, to nanoparticles made of silver (AgNPs) [9].

There are several research projects that use plant extracts high in flavonoids to create silver nanoparticles. In this work, flavonoids are used to try to create silver nanoparticles directly as opposed to plant extracts high in flavonoids. *Vitex pseudo negundo*’s luteolin was isolated, extracted, and utilized to create LuAgNPs nanoparticles.

■ PURPOSE OF THE STUDY

Synthesis luteolin silver nanoparticles (LuAgNPs) then characterization, test antibacterial and cytotoxicity.

■ MATERIALS AND METHODS

Materials

Material used in this study were listed in table 1.

Table 1
Chemicals and materials used

Material	Supplier	Company
Molar Hinton agar	Capricorn	Germany
DMSO	Loba chemie	India
Luteolin	Medochiem	China
MTT	Bio-World	USA
RPMI -1640	Medochiem	China
Molar Hinton agar	Capricorn	Germany
Fetal bovine serum	Capricorn	Germany
Sliver nitrate (AgNO3)	Himedia	India



Methods

Luteolin Silver Nanoparticle Synthesis

After making minor adjustments, [10] used the flavonoid luteolin to chemically reduce a salt solution of silver nitrate to create silver nanoparticles.

Aqueous Silver nitrate Preparation

1 mM aqueous solution of silver nitrate (AgNO_3) was made by combining 0.00425 g of AgNO_3 with 25 mL of deionized water; this mixture was stirred constantly until the clear off-white solution showed.

Luteolin Solution Preparation

Preparing 2 mM Solution of luteolin was done by mixing 0.0025 g of luteolin, with 10 mL of a mixture of methanol (99.8%) and distilled water (1:1 water-alcohol mixture), and the to guarantee that there are no remaining particles in the solution, the mixture was sonicated for five min.

Formation of Luteolin-Loaded Silver Nanoparticles

In order to ensure proper synthesis of the LuAgNPs, the luteolin liquid system was combined with the Mixture of silver nitrate at a ratio of (1:9 and 2:8) and maintained on a magnetic stirrer at 400 rpm for 10–30 min. The mixture was then allowed to rest for 24 h while being shielded from light. The color of the solution was changed slowly from pale yellowish to dark brown depicted the synthesis of silver nanoparticles. It was necessary to measure the spectra of absorption at periods of 10, 20, and 30 min to establish the ideal amount of time for completely reducing AgNO_3 . The reaction was carried out at temperatures of 40 and 70 °C to ascertain the impact of temperature on the synthesis of LuAgNPs. To assess the effect of pH on the synthesis of LuAgNPs, the reaction was carried out at various pH (6, 8 and 7) that were changed using 0.1 N NaOH and 0.1 N HNO_3 . After the synthesis of LuAgNPs, the suspensions were centrifuged at 12 000 rpm for 10 min. Residue was collected, washed with deionized water, and dried in a drying oven for 24 h at 40 °C, and stored at 20 °C for characterizations and further biological activity application.

Luteolin Silver Nanoparticles Characterization

Change of Color

With the naked eye, the solution's hue changed from yellow to dark brown, signifying the bio-reduction of silver nitrate to LuAgNPs [11].

Ultra-Violet Visible Spectroscopy (UV-Vis)

With a wavelength range between 200 and 800 nm, the CECIL7200 UV-visible spectrophotometer was used to monitor the early characterizations of silver nanoparticles. As the blank, luteolin solution was used.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

After centrifuging, collecting, washing, and drying the powdered sample from the prepared solution of LuAgNPs, it was analyzed using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra in order to the groups of molecules in charge of the reducing of silver ions should

be identified. With aid of KBr disc (Shimadzu/84005 at IRAN -Tehran in Tehran university) FTIR analysis was done. The range of the absorbance was 4000 to 500 cm^{-1} [12].

Dynamic Light Scattering (DLS)

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2. 20 was used in conjunction with the Dynamic Light Scattering (DLS) technique to validate the LuAgNPs' size. The experiments were carried out at room temperature using the the Lu AgNPs dry powder was diluted at a 1: 10 ratios with deionized water. The investigation was carried out in Tehran University, IRAN.

X-Ray Diffraction (XRD) Analysis

Using a Bruker 2010/D2Phaser, the crystallization of silver nanoparticles was characterized and examined using X-ray diffraction (XRD). The investigation was carried out in Tehran University, IRAN, using Cu K1 radiation ($\lambda=1.540562 \text{ \AA}$) at 30 mA current and 40 kV voltages.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

At the Tehran University in Iran, the shape of the produced nanoparticles was assessed using a scanning electron microscope (SEM, Germany).

Antibacterial Assay of Ag Nanoparticle

The well diffusion method was used to assess the antibacterial properties of LuAgNPs [13]. Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria were used to evaluate the LuAgNPs. Bacterial isolates utilized in the experiment were provided by the microbiology lab at Basra University's Pharmacy College. The microbial strains were infused in nutritional broth and cultured for 24 h at a temperature of $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. When compared to 0.5 McFarland mixture, which represent $1-2 \times 10^8$ colony forming units (CFU/mL), the turbidity of the culture broths was measured. As a solid growth medium, the medium was evenly placed on Mueller-Hinton agar plates using a sterile swab. To make a well on the surface of the inoculated plate, a sterilized cork borer was used. After diluting silver nanoparticles with DMSO and adding 20 μL of each particle concentration (100, 250, and 500 $\mu\text{g/mL}$) to each pore, the infected plate was pounded with a sterilized cork borer to create a well on the surface. Following that, the plates were left to incubate for 18 to 24 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. measuring the inhibition zones in (mm) used to determine the silver nanoparticles' ability to prevent the growth of the tested microorganisms.

Anti-cancer Assay of Luteolin Silver Nanoparticles

The work done at Gama tech company, Al-Hillah, Iraq.

Cell lines

To test the anti-tumor effects of luteolin and LuAgNPs, breast cancer cell lines were employed (MCF-7).

Growth Media and Culture Conditions

In addition to ten percent foetal bovine serum (BS) and antibiotic doses of 100 unit/ml of penicillin and 0.1 mg/ml of streptomycin, all cell lines were suspended in RPMI



1640 media. Cells line were cultured at 37 °C with 5% CO₂ supply in a humidified incubator (Cypress Diagnostics).

Anti-tumor Assay Method

MTT assay method [14] was used to determine the antitumor activity of luteolin isolated from *Vitex pseudonegundo* grown in Iraq and LuAgNPs. Using 96-well plates for seeding, MCF-7 cell lines were dispersed into 1×10^4 cells/well. Cells were exposed to increasing concentrations of luteolin, LuAgNPs (6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL) after forming a monolayer or incubating for 24 h. 75 h of incubation were followed by the addition of 28 L of a 0.002% w/v MTT solution, and cells were then incubated at 37 °C for 2.5 h before the MTT solution was withdrawn, the remaining crystals in the well were dissolved in 130 µL of dimethyl Sulphoxide, then 15 min of shaking incubation at 37 °C. Using a microplate reader with a 492 nm wave length, the ability to absorb was assessed. There were three runs of the assay. The results of three replicate measurements were provided as mean $\pm$ SEM. IC₅₀ values of luteolin and LuAgNPs were computed after 24 h of treatment using Graph Pad Prism 6 and an inverted microscope to detect the morphological changes to the cell. The cell was seeded onto a 24-well plate and incubated for one day at 37 °C. Crystal violates was used to stain the cells, and after 15 min of incubation stain was washed with water and the cells were examined at 100 times their original size. The percentage of viable cells in each treatment concentration was computed as a ratio of sample to control.

Statistical Analysis

SPSS (statistical package for social science) was used to do the data analysis. The chi-square test, version 240, was used for evaluating means at the $p \leq 0.05$ of significance.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Ag-nanoparticle Synthesis

The optimal conditions were selected according to the composition of the silver nanoparticle and found that it is as follows the volume of luteolin is 1 ml and the temperature is 70 °C and an acid function is equal to 7 and within a period of time not exceeding 10 min.

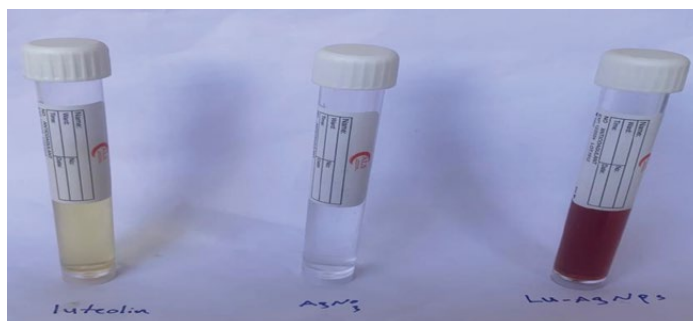


Fig. 1. Color change to Agno3 solution after addition of luteolin

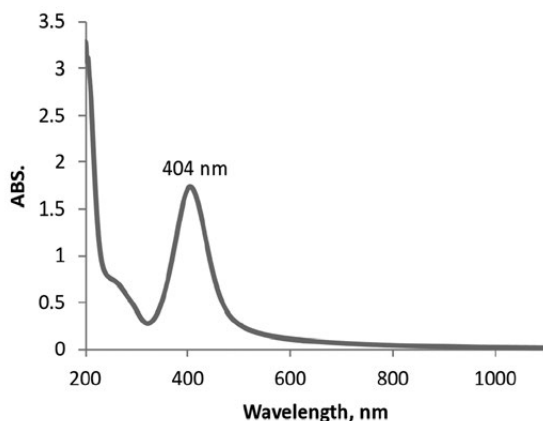


Fig. 2. UV-Visible spectra of luteolin silver nanoparticle show that maximum absorption at 404

Luteolin Silver Nanoparticles Characterization

UV-Visible Spectroscopy

UV-Vis spectroscopy is an essential tool for monitoring the electrical structure and spectral characteristics of the produced nanoparticles (NPs) for observing the production of LuAgNPs [15]. As seen in (Fig. 2), the highest silver nanoparticle concentration at roughly 404 nm caused a reaction to turn brown due to a Plasmon resonance peak. LuAgNPs' UV spectrum was recorded from 10 min. to 24 h. of incubation. As a consequence, 24 h was chosen as the ideal incubation period for the production of AgNPs. localized surface plasmon excitation, emergence of a significant band in the spectral pattern is due to intense light scattering by a field of electricity at a wavelength where the resonance happens.

Fourier-Transform Infrared Spectra (FTIR)

In order to identify the probable functional groups of the biomolecules in the active extracts that may be responsible for the stability of the generated LuAgNPs and the reduction of silver ions, we employed FTIR spectroscopy [16]. At wavenumbers between 4000 and 500 cm^{-1} , luteolin and artificial LuAgNPs were compared. FTIR spectroscopy showed that photochemical analysis of aqueous luteolin, it shows prominent bands of absorbance of CH aliphatic at 3089 cm^{-1} , OHstr at 3398 cm^{-1} , C=Ostr at 1665 cm^{-1} , C=C aromatic at 1613, 1571, 1506 cm^{-1} , C=Ostr at 1665 cm^{-1} , C-Ostr at 1262, 1304, 1205, 1159, and 1118 cm^{-1} . The analysis of the FTIR spectra of the produced silver nanoparticles and aqueous luteolin (Fig. 3). The band changed from 3216 to 3348 cm^{-1} as a result of the vibrations caused by stretching of phenols and the OH of alcohols. The oxidation of alcohol to aldehyde during the reduction of Ag^+ to Ag^0 may be caused by the luteolin's -OH group. [17], The stretching vibration of C-H aliphatic hydrocarbons is responsible for the 3089 to 2924.18 cm^{-1} band, 1665 to 1610. These peaks result from LuAgNPs attaching to amide substituent groups, which boosts LuAgNPs' stability. The stretching vibration of carbonyl (C=O) is responsible for this band [18], 1613 to 1516.10 cm^{-1} band is related to the stretching type of vibration of C=C. The primary phenolic hydroxyls responsible for

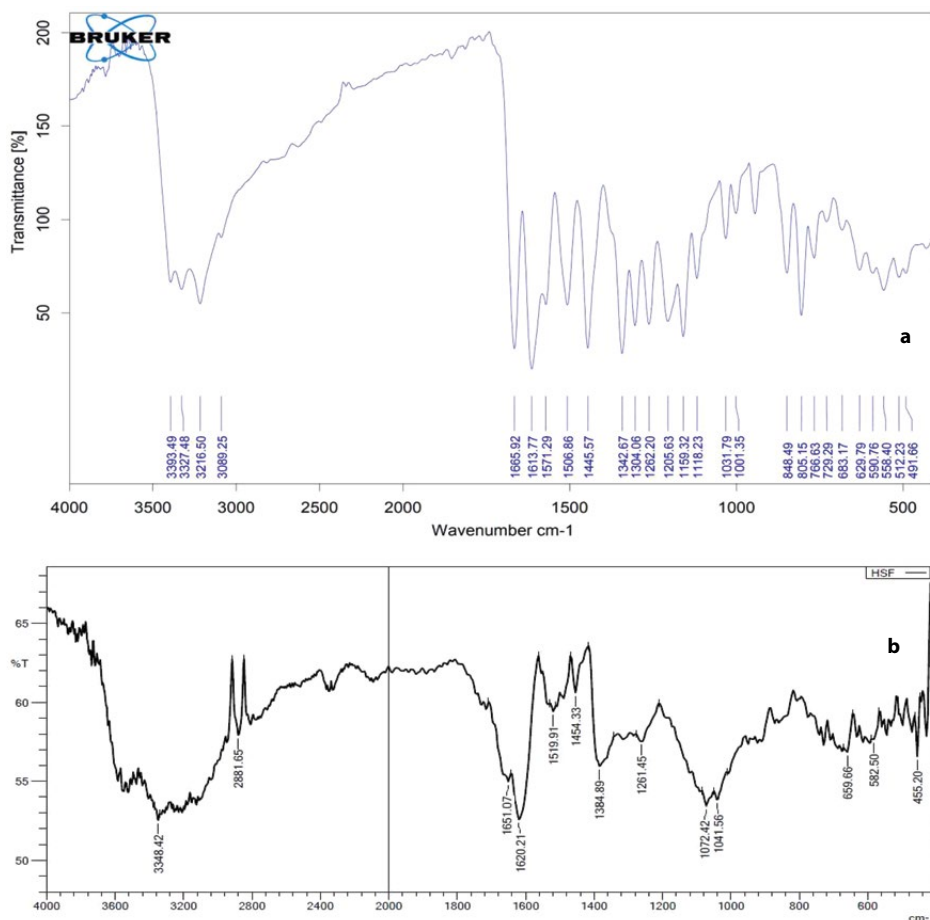


Fig. 3. FTIR spectra of (a) isolated luteolin, (b) luteolin silver nanoparticle

luteolin's key pharmacological activity and the molecular structure of luteolin have not changed, according to the FTIR and characterization investigations.

Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS is based on the relationship between light and nanoparticles. It is possible to measure narrow size distribution with this approach, notably between 2 and 500 nm. To estimate the dispersed the light from a source of light travelling through the particles, it uses Rayleigh scattering method [19]. (Fig. 4) displays the hydrodynamic size distribution of LuAgNPs as calculated by DLS. 72 nm was found to be the average size of LuAgNPs. In this measurement, the Brown's motion theory for the dimension of particles is used. Brownian motion refers to the movement of the particles at arbitrarily in a gas or solutions. The average size of the nanoparticles was determined by examining the dynamic fluctuation of the light's scattering intensity and velocity of the motion of the particles in dispersion [20]. The LuAgNPs had polydispersity index (PDI) values of 0.541,

Table 2
Results of Calculations

Peak number	S.P Area Ratio	S. D	Mean	Mode
One	1.00	78.6 NM	37.0 NM	60.7 NM
Two	...	... NM	... NM	... NM
Three	...	... NM	... NM	... NM
Sum	1.0	78.6 NM	37.0 NM	60.7 NM

Table 3
Operations Cumulative

Zeta-Average	72.0 NM
Polydispersity index	0.541

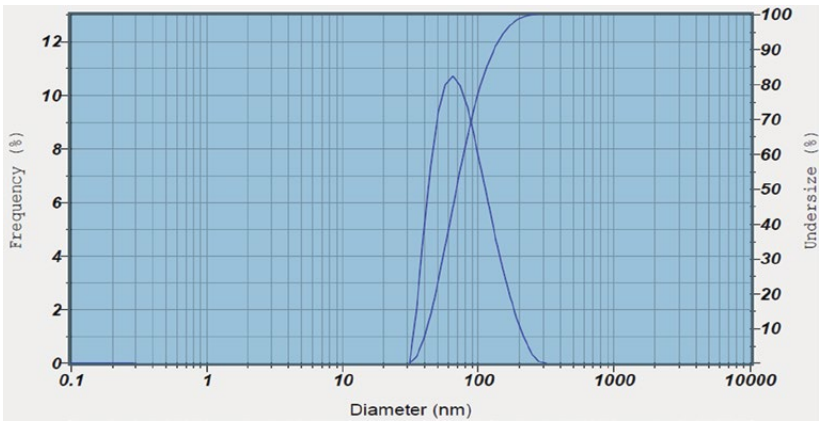


Fig. 4. DLS biosynthesized luteolin silver nanoparticle

which fall between 0 and 1, where 0 denotes monodisperse and 1 denotes polydisperse [20]. This outcome demonstrates unequivocally that the produced LuAgNPs were in a monodisperse phase and that there was little particle aggregation (table 2 and 3).

X-Ray Diffraction (XRD) Analysis

Crystallinity, isomorphous substitution, and particle size may all be determined using XRD (Fig. 5). Additionally, it has the ability to resolve different molecules and qualitatively identify active compounds [21]. When X-ray radiation reflects off of any particle, the number of diffraction peaks that are produced serves as a representation of the physicochemical characteristics of the crystalline lattice [22]. The crystal phase of the produced LuAgNPs was identified using XRD. The obtained LuAgNPs XRD spectra included the 20° to 80° range. 38.942° (110), 44.594° (199), 63.94° (220), and 76.89° (311) were the maxima at 2 values for AgNP-L. The maxima for AgNP-S can be seen in at 38.32° (111), 46.35° (200), 64.56° (220), and 77.40° (311). The identified peaks were compared to the silver library from that of the International Centre for Diffraction Data (ICDD) or the Joint Standing Committee on Powder Diffraction Standardization (JCPDS). On the synthesized LuAgNPs, four peaks were identified as 110, 199, 220, and 311; these peaks corresponded to the

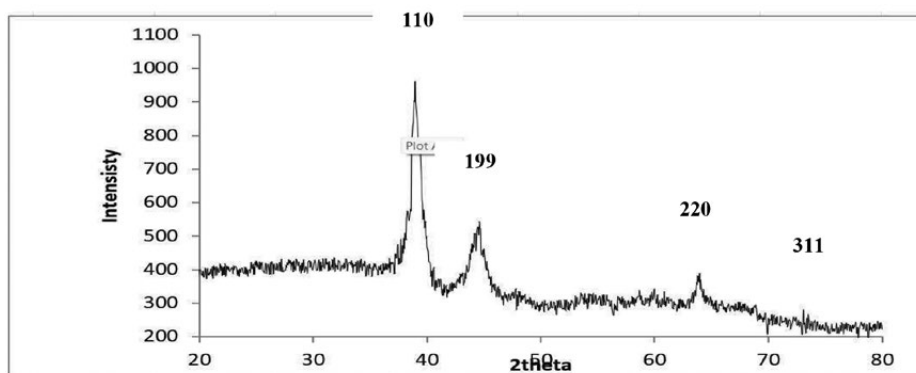


Fig. 5. XRD of the biosynthesized of LuAgNPs

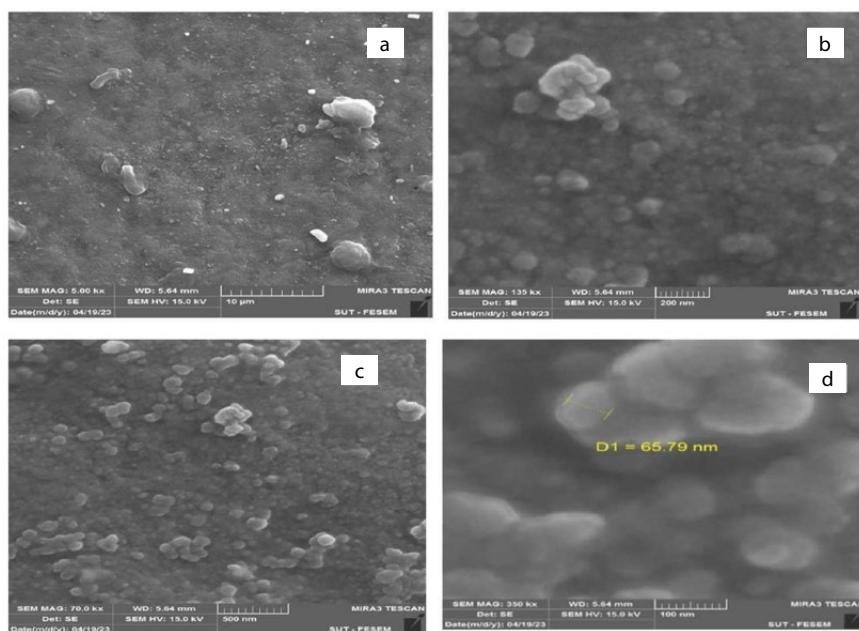


Fig. 6. SEM image of luteolin silver nanoparticle with magnifications: a – 5 kx; b – 70 kx; c – 135 kx; d – 350 kx

face-centered cubic (FCC) structure of silver (JCPDS file no. 04-0783) [23], and nearly same results were reported by [24].

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM is a technique for capturing images of surfaces that has the ability to distinguish between distinct dimensions of particles, particle variability, nanoparticle structures, and the surface appearance of generated NPs at both microscopic and

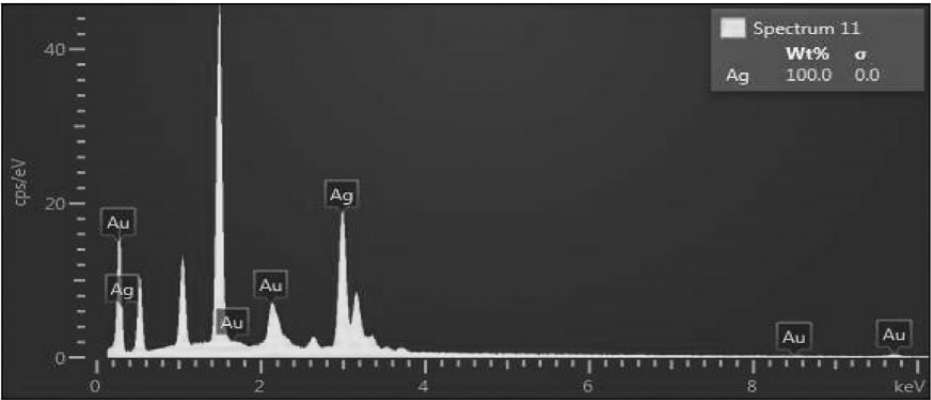


Fig. 7. EDX of luteolin silver nanoparticle

nanoscales [25]. The elements could be examined and the form of the silver nanoparticles could be evaluated using a combination of SEM and EDX. Depending on the SEM pictures (Fig. 6). The LuAgNPs were spherical and had rough surfaces. The larger LuAgNPs aggregates visible in the SEM picture were created as a result of the aggregation of smaller NPs. The synthesis of LuAgNPs was shown by the presence of white color dots in the photograph. Ag may be the primary element in LuAgNPs, according to the EDX spectra, which displayed a strong signal at 3 keV (Fig. 7).

Antibacterial Assay of Luteolin Silver Nanoparticles

Using the well diffusion method, the antibacterial activity of silver nanoparticles was investigated against pathogenic strains of gram-negative *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and gram-positive *Streptococcus pneumoniae*, as well as *Staphylococcus aureus*. supplied by the microbiology lab of Basra University’s pharmacy college. Results of the inhibitory zones created by LuAgNPs’ antibacterial activity are displayed in (table 4 and fig. 8). In contrast to Gram-negative bacteria, gram-positive bacteria have a thicker

Table 4
Anti bacrtial activity of LuAgNPs

Bactria	LuAgNPs conc (g/l)	Inhibition zone (mm)
Escherichia coli	100	25
	250	26
	500	28
Pseudomonas aeruginosa	100	23
	250	27
	500	29
Streptococcus pneumonia	100	20
	250	22
	500	24
Staphylococcus aureus	100	18
	250	23
	500	24

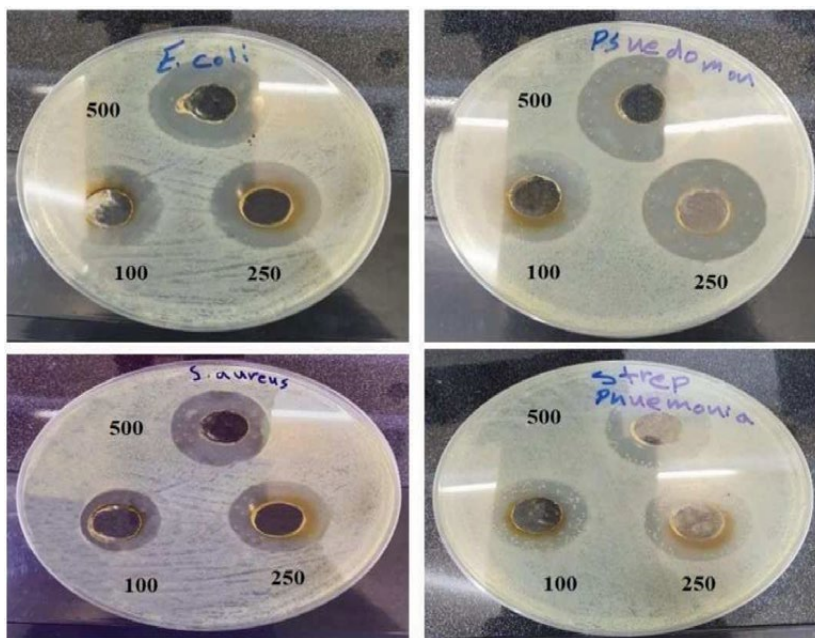


Fig. 8. Antibacterial assay of luteolin silver nanoparticle at different concentration (100, 250, 500 µg/ml)

peptidoglycan coating in their cell walls. Due to the characteristics of the peptidoglycan layer in Gram negative bacteria's cell walls, the biosynthesized LuAgNPs frequently demonstrate stronger antibacterial activities against these bacteria [26].

In-Vitro Cytotoxicity Assay of Luteolin Silver Nanoparticles

The IC₅₀ values of the synthesised silver nanoparticles' anticancer activity in vitro against MCF-7 breast cancer cell lines were calculated using a chart of cell survival evaluated across a variety of concentrations among 1 and 100 g/mL after 24 h of exposure. MTT test, a colorimetric assay that measures the absorbance of a certain wave length in order to assess the anti-cancer activity of the medications or substances, is used to detect the correlation between cell activity and the number of viable cells [27]. The IC₅₀ was calculated for luteolin, LuAgNPs, specifically at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 g/mL against the cell lines. This data's line chart generated an intersection between concentrations (X-axis) and percent inhibition (Y-axis) at 50% inhibition, which was then connected to the concentration value on the X-axis. The findings show that compared to normal luteolin, which had an average IC₅₀ value of 59.59 g/ml, LuAgNPs had considerable cytotoxic action with an average IC₅₀ value of 7.45 g/ml and significantly inhibited the proliferation of cancer cells (Fig. 9 and 10). The significant discrepancy between luteolin and LuAgNPs' IC₅₀ And the the outcome demonstrated a significant difference below the threshold of significance of $p \leq 0.05$. ($\chi^2=0.00$, $df=8$, p value =41.925). It is not difficult to imagine that the accessibility of a particle's surface area determines how it interacts with a cancer cell. Because of their higher surface area, smaller particles have more anticancer activity than bigger ones [28].

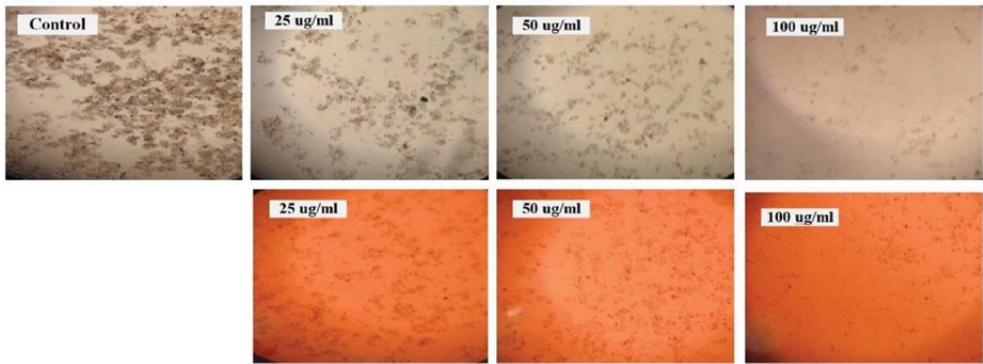


Fig. 9. Microscopic observations of the cytotoxic of AgNPs (in brown) and standard luteolin (in orange) on MFC-7 cell lines with different concentrations, control (untreated MFC-7 cell lines)

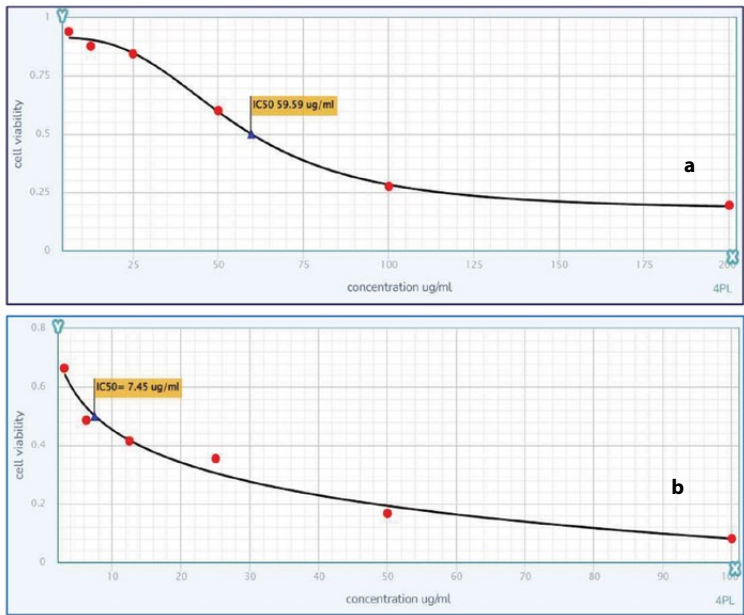


Fig. 10. Computing IC50 values using fractional cells in GraphPad Prism 6. The concentration at which the curve crosses the 50% inhibition threshold is known as the IC50 (a) MFC-7 cells treated with LuAgNPs for 24 h; (b) MFC-7 cells treated with standard luteolin

CONCLUSION

Under optimal circumstances of 70 °C and pH 7, LU-AgNPs were generated employing isolation luteolin as a reducing and capping agent. Using UV-VIS, FTIR, XRD, and SEM methods, these synthesized LU-AgNPs were examined. The spherical form of LU-AgNPs revealed a typical particle size of 65.79 nm. According to the antibacterial tests, LU-AgNPs



shows promising antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The anti-cancer activity for LU-AgNPs was significantly higher than that of free Luteolin with IC50 value 7.45 g/l.

■ REFERENCES

1. Thapliyal A., Chandra A. Antibacterial and anticancer potential of silver nanoparticles synthesized using gallic acid in bentonite/starch biocomposites. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2018;178–89.
2. Abdul-Karim E.K., Hussein H.Z. The biosynthesis of nanoparticles by fungi and the role of nanoparticles in resisting of pathogenic fungi to plants: a review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 2022;35(1):243–56.
3. Keerthiga N., Anitha R., Rajeshkumar S., Lakshmi T. Antioxidant activity of cumin oil mediated silver nanoparticles. *Pharmacognosy Journal*. 2019;11(4).
4. Almohammed H.J., Albalawi A.E., Al Sadoun H., Bakhtari N., Amraei M., Moghaddam A., et al. Applying nanoparticles for treating giardia infection: a systematic review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(5):15–9.
5. NW Ali Z., BA Alabdulaziz M. Green Synthesis of Cobalt Nanoparticles and their Application in Removal of Lead from Polluted Water. *Basrah Journal of Science*. 2021;39(2):292–305.
6. Sangour M.H., Ali I.M., Atwan Z.W., Al Ali A.A.A.L.A. Effect of Ag nanoparticles on viability of MCF-7 and Vero cell lines and gene expression of apoptotic genes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2021;22:1–11.
7. Caio H., Barros I., Fulaz S., Stanisic D., Tasic L. Biogenic nanosilver against multidrug-resistant bacteria (MDRB) antibiotics. *Antibiotics*. 2018;7:69.
8. Al-Mudhafar S., Al-Hamdani M.A. Evaluation for antibacterial and antiproliferative activity against cancer cell lines of biosynthesized silver nanoparticles from Vitex Agnus-Castus and Uncaria Tomentosa extracts. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*. 2021;47(1).
9. Al-Musawi Z.F., Al-Saadi N.H. Antitumor activities of biosynthesized silver nanoparticles using Dodonaea viscosa (L.) leaves extract. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 2021;34(2):42–59.
10. Ramirez-Rosas S.L., Delgado-Alvarado E., Sanchez-Vargas L.O., Herrera-May A.L., Peña-Juarez M.G., Gonzalez-Calderon J.A. Green Route to Produce Silver Nanoparticles Using the Bioactive Flavonoid Quercetin as a Reducing Agent and Food Anti-Caking Agents as Stabilizers. *Nanomaterials*. 2022;12(19):3545.
11. Raut R.W., Mendhulkar V.D., Kashid S.B. Photosensitized synthesis of silver nanoparticles using Withania somnifera leaf powder and silver nitrate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014;132:45–55.
12. Khan M., Khan M., Adil S.F., Tahir M.N., Tremel W., Alkhatlan H.Z., et al. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by Pulicaria glutinosa extract. *International journal of nanomedicine*. 2013:1507–16.
13. Huq M.A. Green synthesis of silver nanoparticles using Pseudoduganella eburnea MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(4):1510.
14. Aydogmus-Öztürk F., Jahan H., Beyazit N., Günaydin K., Choudhary M.I. The anticancer activity of visnagin, isolated from Ammi visnaga L., against the human malignant melanoma cell lines, HT 144. *Molecular biology reports*. 2019;46:1709–14.
15. Mat Yusuf S.N.A., Che Mood C.N.A., Ahmad N.H., Sandai D., Lee C.K., Lim V. Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich Clinacanthus nutans leaf and stem aqueous extracts. *Royal Society open science*. 2020;7(7):200065.
16. Kharat S.N., Mendhulkar V.D. Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using Elephantopus scaber leaf extract. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;62:719–24.
17. Lokina S., Stephen A., Kaviyaranan V., Arulvasu C., Narayanan V. Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles. *European journal of medicinal chemistry*. 2014;76:256–63.
18. Kanipandian N., Thirumurugan R. A feasible approach to phyto-mediated synthesis of silver nanoparticles using industrial crop Gossypium hirsutum (cotton) extract as stabilizing agent and assessment of its in vitro biomedical potential. *Industrial Crops and Products*. 2014;55:1–10.
19. Lin P.-C., Lin S., Wang P.-C., Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology advances*. 2014;32(4):711–26.
20. Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*. 2008;101(2):239–53.
21. Waseda Y., Matsubara E., Shinoda K. *X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems*. Springer Science & Business Media; 2011.
22. Bar H., Bhui D.K., Sahoo G.P., Sarkar P., De S.P., Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of Jatropha curcas. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*. 2009;339(1–3):134–9.
23. Sidjui L., Ponnankajamdeen M., Malini M., Famen L., Sindhu R., Chandirika J.U., et al. Lova trichiloides root back mediated green synthesis of silver nanoparticles and rating of its antioxidant and antibacterial activity against clinical pathogens. *Journal of Nanoscience and Technology*. 2015:32–6.
24. Begum N., MH M.I., Mathew S., Govindaraju A., Qadri I. Green synthesis, antioxidant potential and hypoglycemic effect of silver nanoparticles using Ethanolic leaf extract of Clausena anisata (Willd.) Hook. F. Ex Benth. of Rutaceae. *Pharmacognosy Journal*. 2016;8(6).
25. Fissan H., Ristig S., Kaminski H., Asbach C., Eppe M. Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Analytical Methods*. 2014;6(18):7324–34.
26. Bhakya S., Muthukrishnan S., Sukumaran M., Muthukumar M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. *Applied Nanoscience*. 2016;6:755–66.
27. Cree I.A. *Cancer cell culture: methods and protocols*. Springer; 2011.
28. Lee S.H., Jun B.-H. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(4):865.



Mohammed M.M.¹, Khudor M.H.², Ibraheim H.K.²✉

¹ Basrah College of Sciences and Technology, Basrah, Iraq

² College of Veterinary Medicine, Basrah, Iraq

Inactivated Vaccine Against Staphylococcus Aureus: Its Effect on the Nature of the Immuno-Inflammatory Response (Based on the Dynamics of the Level of Cytokines IL6, IL4 and IgG) and Therapeutic and Prophylactic Reliability of Use (Experimental Study)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Mohammed M.M. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation; writing – original draft; Khudor M.H. – supervision, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft; Ibraheim H.K. – supervision; formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft.

Ethics statement. This work approved by Basrah College of Sciences and Technology. The experiment was conducted in accordance with the ethical principle for animal experiments of the College of Veterinary Medicine at the University of Basrah (No.113).

The article is published in the author's edition.

Submitted: 06.09.2023

Accepted: 22.01.2024

Contacts: mohamed.khudor@uobasrah.edu.iq

Abstract

Introduction. Staphylococcus aureus is classified as a dangerous pathogenic organism that causes several disorders in both humans and animals. The antibiotic resistance is a serious public health problem. Immunization still the best way to prevent and cure the S. aureus infection.

Purpose. Study of the impact of the created inactivated vaccine against S. aureus on the formation of an immuno-inflammatory response in the body of experimental animals by changes in the blood levels of pro- and anti-inflammatory cytokines IL6 and IL4, total immunoglobulin G and assessment of biological reliability.

Materials and methods. Bacterial inactivated vaccine technology prepared in this study by treated the bacterial cells with NaOH to obtained whole surface antigens. The prepared vaccine was injected in rats with 1×10^6 cells/ml to investigate the immunity response. The treated bacterial cells were examined by using scanning electron microscope (SEM). The experimental animal divided in to four groups which include the non-treated group (CT) control, group were injected with 300µl PBS. Intramuscular immunized (IM) group, intravenous immunized (IV) group and subcutaneous immunized (SC) group were injected with 300 µl of inactivated S. aureus vaccine at zero day and with 250µl booster dose at 14 and 28 days.

Results. In all vaccinated groups, a significant increase in the levels of IL6 and IL4 was noted in comparison with similar test indicators in the group of unvaccinated animals ($p < 0.05$). The identified changes were accompanied by an increase in the total IgG content as a result of the use of an inactivated vaccine in all "therapeutic" (with animal vaccination) groups ($p < 0.05$). The results showed that the developed vaccine induced immunity and provided reliable protection in a bacterial challenge test.



Conclusion. The inactivated *S. aureus* whole surface antigens vaccine give the protection to the experimental animals 100% against methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) homologous challenge which considered big issue for humans and animals and threat the public health.

Keywords: staphylococcus aureus, surface antigens, rats, ELISA, IL4, IL6

Мохаммед М.М.¹, Худор М.Х.², Ибрагим Х.К.²✉

¹ Научно-технический колледж Университета Басры, Басра, Ирак

² Колледж ветеринарной медицины Университета Басры, Басра, Ирак

Инактивированная вакцина против *Staphylococcus aureus*: ее влияние на характер иммуновоспалительного ответа (по динамике уровня цитокинов IL6, IL4 и IgG) и лечебно-профилактическая надежность применения (экспериментальное исследование)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Мохаммед М.М. – концепция, методология, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, анализ результатов исследования, написание исходного текста статьи; Худор М.Х. – научное руководство, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, анализ результатов исследования, написание исходного текста статьи; Ибрагим Х.К. – научное руководство, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, анализ результатов исследования, написание исходного текста статьи.

Этическое заявление. Данная работа одобрена Научно-техническим колледжем Университета Басры. Эксперимент проводился в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными Колледжа ветеринарной медицины Университета Басры (№113).

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 06.09.2023

Принята: 22.01.2024

Контакты: mohamed.khudor@uobasrah.edu.iq

Резюме

Введение. Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) входит в группу наиболее опасных патогенных микроорганизмов, вызывающих ряд заболеваний как у людей, так и у животных. Его устойчивость к антибактериальным препаратам представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Наиболее эффективным способом профилактики и лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, по-прежнему является вакцинация.

Цель. Исследование воздействия созданной инактивированной вакцины против *S. aureus* на формирование иммуновоспалительного ответа в организме экспериментальных животных, выражающегося в изменении содержания в крови про- и противовоспалительных цитокинов IL6 и IL4 и общего иммуноглобулина G, и оценка ее биологической надежности.

Материалы и методы. Технология приготовления бактериальной инактивированной вакцины в данном исследовании включала обработку бактериальных клеток

раствором едкого натра (NaOH) для получения поверхностных цельноклеточных антигенов. Приготовленную вакцину вводили крысам в объеме 1×10^6 клеток/мл для изучения иммуновоспалительного ответа. Обработанные бактериальные клетки исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Экспериментальных животных разделили на четыре группы, включая контрольную (без введения в организм вакцины, СТ). Животным контрольной группы вводили 300 мкл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS). Животным групп внутримышечной вакцинации (IM), внутривенной вакцинации (IV) и подкожной вакцинации (SC) вводили 300 мкл инаktivированной вакцины *S. aureus* в нулевой день и 250 мкл бустерной дозы в 14-й и 28-й дни исследования.

Результаты. Во всех вакцинированных группах отмечено достоверное повышение уровней IL6 и IL4 в сравнении с аналогичными показателями тестов в группе невакцинированных животных ($p < 0,05$). Выявленные изменения сопровождались увеличением общего содержания IgG в результате применения инаktivированной вакцины во всех «лечебных» (с вакцинацией животных) группах ($p < 0,05$). Полученные результаты показали, что разработанная вакцина индуцировала иммунитет и обеспечила надежную защиту при проведении теста с бактериальным заражением.

Закключение. Инаktivированная цельноклеточная (цельновирсионная) вакцина с поверхностными антигенами *S. aureus* обеспечивала 100%-ную защиту экспериментальных животных от гомологического заражения метициллин-резистентным *S. aureus* (MRSA), представляющего собой серьезную угрозу здоровью людей и животных и проблему для общественного здравоохранения.

Ключевые слова: *staphylococcus aureus*, поверхностные антигены, крысы, ИФА (ELISA), IL4, IL6

■ INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an opportunistic human and animal pathogen that contaminates food and causes a wide range of infections, from skin and soft tissue infections to life-threatening illnesses [1], include toxic shock syndrome, osteomyelitis, septicemia, endocarditis, and pneumonia [2]. Drug resistance in *S. aureus* has been increasing steadily in recent years as a result of the abuse of antibiotics such as using them without a prescription, in large dosages, or for no reason [3], which caused bacterial evolution [4]. Methicillin-resistant often known as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is resistant to most Beta lactam antibiotics as a result of the penicillin-binding proteins (PBPs) alteration that are repressed by antibiotics being replaced by PBP (PBP2a) function with limited affinity for most Beta lactam antibiotic resistant to methicillin in animals [5]. The threat of *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) to human and animal health is significant [6]. This bacterial strain causes a number of illnesses that range from mild skin infections to serious, sometimes lethal disorders [7]. Up to 40% of instances of mastitis in dairy cows are caused by a variety of bacteria, with *Staphylococcus aureus* being the predominant pathogen among them [8]. Immunization is still the best way to prevent and cure *S. aureus* infections, even if there aren't many viable therapies for multidrug-resistant *S. aureus* strains [9].



The creation of innovative vaccine production technology that is efficient, simple, and effective is crucial to managing bacterial infection [9]. Extracellular vesicles, bacterial cell wall components and toxins are examples of typical biological nano-materials that will be used in vaccines and treatments in the future [10]. Non-living vaccine development provide a promising method for vaccine development. The empty, non-living cell envelope transmembrane structures develop on the cell surface as a result of action of sodium hydroxide (NaOH) leaving the cell envelopes vacant. The resultant of surface antigens of *S. aureus* benefits immune responses and protection against certain infections in experimental animal models [11]. The minimum inhibitory concentration and minimum growth concentrations of sodium hydroxide (NaOH), sodium dodecyl sulfate (SDS), and calcium carbonate were utilized in a novel method for generating multivalent surface antigens [12]. The NaOH mechanism was faster method of vaccine induction nonliving (cell wall surface antigens).

S. aureus peptidoglycan vaccination in experimental animals led to the acquisition of protective immunity against a fatal challenge [13]. Recent research revealed that vaccination of experimental animals with a cocktail of four surface antigens (IsdA, IsdB, serine-aspartate repeat A [SdrA], and SdrE) generated in opsonophagocytic antibodies and substantially protected against clinical *S. aureus* isolates. Components of the *S. aureus* cell wall have been reported to both humoral and cell-mediated immunity to be boosted [14].

Immune responses, hematopoiesis, inflammation, wound healing, and trauma all depend on cytokines, which are significant immunoregulators. Cytokines are a group of minor, secreted proteins that regulate a number of aspects of cell development and differentiation in certain cell types [15]. A strong pleiotropic cytokine, IL-4 controls cellular activation, differentiation, and apoptosis rescue and IL-4 causes the activation receptors to be down-regulated in mast cells and encourages cell death [16]. IL-4 plays a variety of biological tasks, including promoting the growth of T and B cells that have been activated as well as plasma cell differentiation in B cells [17]. Interleukin-6 (IL-6) is important for regulating temperature and metabolic activity as well as other components of the inflammatory response [16]. It is still hard to tell exactly how IL-6 plays a function in the pathophysiology of inflammation. In fact, IL-6 has been linked to both pro- and anti-inflammatory actions [18]. In the present study, using the MIC of NaOH, we developed new *S. aureus* surface antigens vaccine.

■ PURPOSE OF THE STUDY

Study of the impact of the created inactivated vaccine against *S. aureus* on the formation of an immuno-inflammatory response in the body of experimental animals by changes in the blood levels of pro- and anti-inflammatory cytokines IL6 and IL4, total immunoglobulin G and assessment of biological reliability.

■ MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Five suspected *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis condition were obtained using sterile test tubes from Basrah dairy farms. The samples were collected between February 2022 to April 2022, and analysis was done after collection. The laboratory work was completed in Basrah Veterinary College.

Isolation and identification of S. aureus

According to a previous research [6], the milk samples were analysis for the isolation and identification of bacteria. The identification of S. aureus performed by Using the VITEK 2 system for each suspected isolate and the identification was verified using a molecular technique.

Molecular method

The genomic DNA was extracted by using (Bioneer/Korea) kitgenomic DNA from bacterial cells using the Gram-positive bacterial methodology. Conventional PCR amplification of essential nuc gene was used to amplify by using specific primers (Table 1). The PCR program was carried out as in Table 2.

Preparation the inactivated bacterial vaccine

Determination of NaOH MIC

Determination the MIC of NaOH for S. aureus was performed by using broth dilution method [19], bacterial culture of S. aureus was grown in nutrient agar and adjusted to 1×10^8 CFU/ml. The initial concentrations of NaOH were used as 10 mg/dl, 8 mg/dl, 7.5 mg/dl, 6 mg/dl and 5 mg/dl. The solution of NaOH were added to samples of the bacterial culture, and they were incubated at 37°C for 18 h. After incubation, the turbidity of each individual tube was assessed visually and the MIC was determined as the lowest concentration of NaOH that inhibit bacterial growth.

Production of inactivated vaccine

Inactivated S. aureus vaccine was produced by using the MIC of NaOH method as described previously [19]. In briefly, the biomass of 72-h-old S. aureus cells was collected by centrifugation (10,000 g for 10 min at 4°C) and washed three times with phosphate-buffered saline. One milliliter of the MIC of NaOH was added to 2 ml of the bacterial suspension (1×10^8 CFU/ml) and incubated at 37°C for 75 min. To determine the lysis rate, samples of cells treated with the MIC of NaOH and non-treated control cells were collected

Table 1
Nuc gene primers sequences with product size

Primer	Sequences of the primer (5 to 3)		Product size	Reference
nuc gene	Forward	GCCATTGATGGTGATACGGT	279 bp	(Fasihi et al., 2017)
	Reverse	AGCCAAGGTTGACGAATAAGC		

Table 2
The specific program of amplification the nuc gene

No	Stage	Temp/C	Time	Cycle
1	Initial denaturation	94	5 min	1
2	Denaturation	94	1 min	34
3	Annealing	55	1 min	34
4	Extension	72	1 min	34
	Final extension	72	10 min	1



at 15-min intervals (15, 30, 45, 60, and 75 min) then spread onto mannitol salt agar plates. After incubation at 37°C for 24 h, viable colonies were enumerated and the numbers of CFU/ml compared with control plate.

Determination of the DNA concentration of prepared vaccine

Samples of bacterial cells treated with the MIC of NaOH and non-treated control cells were collected. Their genomic DNA was extracted by using isolation kit (persto mini DNA extraction kit), according to the manufacturer's instructions. The extracted genomic DNA was analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

Sample preparation and examination by Scanning electron microscope examination

Morphological features of inactivated *S. aureus* vaccine were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) [19].

Experimental animals

A total of 125 male Wistar albino rats (8 weeks age and 200–220 grams body weight / animal) were used. 75 of them were used in the vaccination program (Sc, IM and IV) whereas 25 of them were used as a control (CT) to determine the protection level of the prepared vaccine in challenge test at the end of the study, finally 25 of them have been used in the safety test to determine safety of each prepared vaccine in this study. Experiment using vaccination and challenge. A set of 100 rats were separated into four groups and given the names Ct, SC, IM, and IV in order to evaluate the immunogenicity and protective effectiveness of *S. aureus* inactivated vaccine. Sterilized PBS (300 µl) was administered subcutaneously to Group Ct rats (the non-immunized control group). The vaccine (1×10^6 cells/ml) in sterile PBS was administered intravenously, subcutaneously, and intramuscular to the rats in Group IM, Sc, and IV, respectively. Rats from Sc, IM and IV received three vaccinations at intervals of day 1, 14 and finally day 28. All rats were administered an intravenous with 300 µl of the challenge dose with virulent *S. aureus* at 2×10^8 CFU/ml of PBS two weeks following the previous inoculation (week 7). Blood samples were obtained from each rat's tail vein to assess the immunological response at several days (day 5, day 19 and day 33) for ELISA assay.

ELISA assay

According to the manufacturers' instructions, ELABSCIENCE®/USA ELISA kits were used to measure the quantities of IL6 and IL4 as well as IgG.

Statistical analysis

SPSS version 24 were used and ANOVA with LSD test used for data analysis, the significant differences between groups measured at P value ≤ 0.05 with mean Standard deviation.

■ RESULTS

Identification of MRSA

Five suspicious isolates from cows suffering from mastitis were analyzed using cultural methods. The five suspicious isolates were submitted to the Vitek 2 compact system that

GP identity card after performing the culture approach for primary identification. The results of Vitek2 revealed that underwent biochemical identification using a turbidity and colorimetric basis, with 99% portable analytical results.

Molecular Detection

After performing agarose gel electrophoresis, the nuc gene was amplified using specific primers, and the results showed a distinct band with a 279 bp size, indicating that the suspected isolates with positive vitek 2 compact system results also had positive PCR findings for the nuc gene (Fig. 1).

Antibiotics susceptibility testing

The Vitek 2 compact device was used to determine the antibiotics susceptibility of PCR-positive *S. aureus* isolates. The isolates were tested positive for resistance to more than 80% (20) of drugs from several antibiotics families. According to antibiotics sensitivity testing, all isolates was resist to Oxacillin which refer as all isolates were Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) cause the use of cefoxitin as a surrogate marker for detection of mecA gene mediated methicillin resistance.

Minimum inhibitory concentration of NaOH

The results showed the minimum inhibition concentration of NaOH appears minor growth was observed with the concentration of 8.0 mg/ml for 60 min that decrease number of CFU on the nutrient agar as in Fig. 2.

Determination of the DNA concentration of prepared vaccine by Electrophoresis

After DNA extraction of treated isolates and control isolates DNA was run by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide, the results showed clear bands of total extracted DNA of control while there were no clear bands for prepared vaccine of treated isolates with NaOH (Fig. 3).

Scanning electron microscope (SEM) examination

After scanning electron microscopy (SEM) examination of the treated cells. The control untreated *S. aureus* cells (Fig. 4 (A)). The image revealed the formation of transmembrane

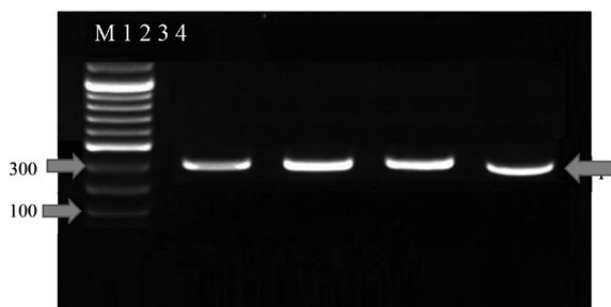


Fig. 1. Amplification results of using nuc gene (lane 1–4) primer with 279 bp, L.M.: marker. Agarose 1% concentration

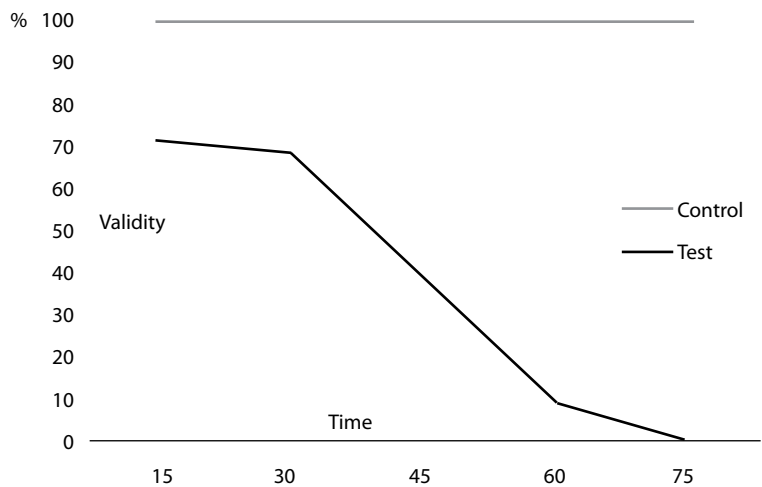


Fig. 2. The Curve of MRSA in CFU/ml different time after treated with NaOH

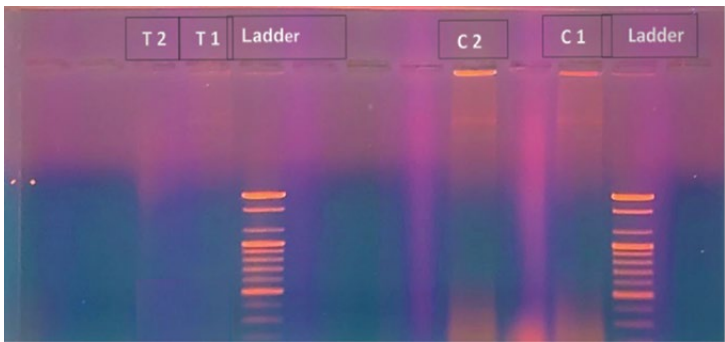


Fig. 3. Electrophoresis showed clear bands for C1 & C2 (control1 and Control2) while there were no band for both T1 and T2 (treated1 and Treated 2)

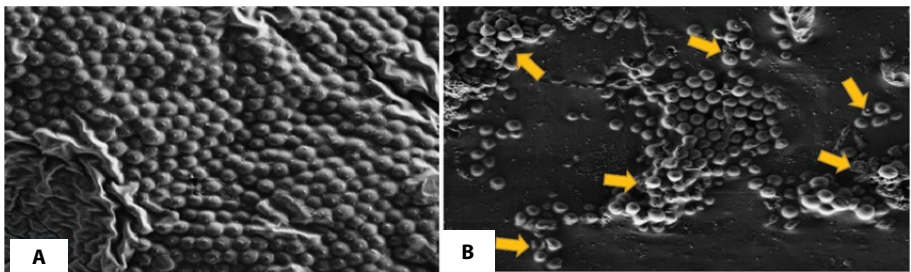


Fig. 4. A – SEM images for control untreated *S. aureus* cells; B – showed the transmembrane channel formation for treated *S. aureus* cells and production of Ghost cells

lysis tunnel structures in the treated cells, which are indicated by yellow arrows in the figure below. Additionally, the procedure of treatment with MIC of NaOH did not change the cell's morphology or cause damage to the cells, which is assumed to be a crucial component of surface antigens (Fig. 4 (B)).

ELISA Results
IL6 concentration

Utilizing an ELISA kit to measure IL6, results revealed that all vaccine groups had increasing amounts of the immune ligand 6 (IL6) at days 5, 19, and 33 compared to the non-vaccinated group, with statistically significant differences ($P\leq0.05$) were found. IV group had the highest levels of concentration between all vaccinated groups (Table 3).

IL4 concentration

Using an ELISA kit for measuring IL4, it was revealed that all vaccine groups had elevated concentration of IL4 at days 5, 19, and 33 compared to the non-vaccinated group, with statistically significant differences ($P\leq0.05$) were found. The IM group displayed the highly concentration of all groups (Table 4).

IgG concentration

ELISA IgG test results indicated that all vaccinated groups had increasing levels of IgG than the non-vaccinated group at days 5, 19, and 33, with significant differences. The IM group had the highest concentration (Table 5).

Table 3
The concentration of IL-6 (µg/l) at 5, 19 and 33 day in vaccinated and non-vaccinated groups

Groups of animal	Period of observation	IL-6 (µg/l)		
		Day 5	Day 19	Day 33
Ct		3.1±1.5	3.3±1.6	2.8±1.8
IV		28.5±2.7	54.8±5.9	77.2±11.5
IM		8.4±3.0	25.55±7.75	38.25±10.45
SC		27.15±4.25	54.4±15.9	67.95±12.25

Note: data were presented as mean±SD; Significance value under $P\leq0.05$.

Table 4
The concentration of IL-4 (µg/l) at 5, 19 and 33 day in vaccinated and non-vaccinated groups

Groups of animal	Period of observation	IL-4 (µg/l)		
		Day 5	Day 19	Day 33
Ct		57±9.0	48±12	51±8.5
IV		83.5±14.5	154±66	158±62
IM		78±12	114±30	250±148
SC		178.5 ±71.5	115±17	196.5±44.5

Note: data were presented as mean±SD; significance value under $P\leq0.05$.



Table 5
The concentration of IgG (µg/l) at 5, 19 and 33 day in vaccinated group and non-vaccinated group

Groups of animal	Period of observation		
	IgG (µg/l)		
	Day 5	Day 19	Day 33
Ct	3.1±1.5	3.3±1.6	2.8±1.8
IV	28.5±2.7	54.8±5.9	77.2±11.5
IM	8.4±3.0	25.55±7.75	38.25±10.45
SC	27.15±4.25	54.4±15.9	67.95±12.25

Note: data were presented as mean±SD; significance value under $P \leq 0.05$.

Table 6
Percentage and number of death and a live animals after challenge test

Group	No.	Live	Death	Survival Percentage
Ct	10	3	7	30
SC	10	10	0	100
IM	10	10	0	100
IV	10	10	0	100

Challenge test

The challenge test was conducted on day 42 of the study to evaluate the level of protection provided by the prepared vaccine that elicited an immune response in rats. The test revealed the proportion of animals that survived when compared to control animals that had not received the prepared vaccine. Animal survival rates were 100%, and every animal that had received vaccinations via various injection techniques survived. More than 70% percentage death occurred in the unvaccinated group while displaying the virulent bacterium with a dosage of $5,526 \times 10^{10}$ CFU/ml, which represented LD₅₀ (Table 6).

DISCUSSION

Staphylococcus aureus bacteria had a number of essential virulence characteristics that contributed to the grave illness they caused in both humans and animals [20], therefor the vaccination could be a better solution for *S. aureus* management.

In this study, we observed that the Vitek method produced positive outcomes as a *S. aureus* with a higher confidence rate (99%) for all suspected isolates that demonstrated a clear growth on mannitol salt agar. Also, when conducted a traditional PCR investigation, all of these positive isolates showed distinct nuc gene bands. The compatibility of the PCR with the Vitek system results was agree with many studies such as [21–25] a which these studies evaluated the performance of Vitek system with other methods. The Vitek system is regarded as one of the more effective and affordable choices for the regular detection of microorganisms.

Due to certain isolates' resistance to ceftiofur, which indicates that all isolates are Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), ceftiofur is used as a surrogate marker for the identification of mecA- gene-mediated methicillin resistance. The results agreement with [26, 27], which they recorded as a higher percentage of MRSA percentage with *S. aureus* isolates. The high incidence of multidrug-resistant MRSA in milk samples in

this investigation may be attributed to producers' overuse of antibiotics and unhygienic farming practices. The public health of the owners may suffer as a result.

The development of a reliable inactivated *S. aureus* vaccine is urgently needed for infection control and prevention. The use of NaOH was easier and less expensive than other approaches like the E-mediated lysis procedure [24]. In this study, established that the development of a new inactivated vaccine may be achieved by rapidly and effectively lysing *S. aureus* cells using NaOH. The *S. aureus* cells were treated with 8.0 mg/ml of MIC NaOH, which showed a high lysis ratio after 60 minutes. This inline to the study conducted by [25] in which *S. aureus* cells were treated with 7.5 mg/ml of NaOH, and the effectiveness of the lysis appeared after 60 minutes, indicating that the chemical approach of NaOH MIC was the most efficient and swift.

Using SEM, we compared the production of chemically inactivated vaccine in treated cells that had been exposed to MIC of NaOH to untreated cells. The photos following the NaOH treatment's lysis period showed the presence of a transmembrane lysis tunnel. The images showed same results of another study [25] which observed the similar morphological alterations in the treated cells due to transmembrane tunnel development, which caused the cells to be evacuated and become empty cells.

In contrast to control cells, which showed a clear band of genomic material after being exposed to MIC of NaOH for 60 min, the exposed cells showed no DNA bands after agarose gel electrophoresis. It was taken into consideration as a major signal that the created inactivated vaccine was missing both DNA and cells' genetic components. The results matching with study of [24] These studies support the hypothesis that DNA free of prepared inactivated vaccines may be effectively induced using the NaOH method.

Our findings show a significant increase in IL-6 levels in rats given the prepared inactivated vaccine, supporting the potential of the vaccine to stimulate the production of proinflammatory and inflammatory cytokines, which play different roles in the immune response [26]. These findings were consistent with [27] that revealed an increase in IL6 in animals following *S. aureus* vaccination. This finding is in line with descriptions of IL-6 many effects on T cells that have previously been reported, including its ability to promote the growth and differentiation of CD4+ [28]. Further encouraging the growth of peripheral naive and memory T lymphocytes. It has been demonstrated that IL-6 has the power to significantly increase the proliferation of Th1 cells, making them immune to suppression [29].

Our results reveal a considerable rise in IL-4 levels in rats given the produced inactivated vaccine, which may point to an improved humoral immune response. Our findings concur with those of [30] who showed that immunization increased IL-4 levels. T-helper cells may develop primarily into Th1 and Th2 cells, and IL-4 influence on naive CD4+ T-cells or TH0 (naive T-helper) causes their differentiation into Th2 cells when it occurs for the first time during the vaccination process. One of IL-4 key roles is to induce Th2 cells to produce additional IL-4, which directly impacts B cells and causes them to differentiate into plasma cells, which are responsible for producing specialized antibodies [31].

Over the study period, the IgG rate had increased in each group relative to the non-vaccinated group, achieving their peak in the SC group on day 19. These outcomes were in line with a [19] that showed an increase in IgG levels following vaccination with a inactivated *S. aureus* vaccine. throughout the vaccination period. The IgG antibody levels in the vaccinated groups also increased significantly after each booster injection with



inactivated vaccine, with SC group rats displaying the strongest IgG antibody response. The results confirm that immunization of rats with prepared vaccines can strongly stimulate the production of antibodies and provide protection against virulent strains.

The challenge test findings of the vaccinated group and the non-vaccinated group following injection with a virulent isolate the final results showed that the vaccinated group had 100% more protection than the non-vaccinated group. The vaccinated groups had no a mortality risk, in contrast to the non-vaccinated group, which had a death rate of 70%. We suggested that animals be protected against homologous challenges by receiving full immunity and defense against pathogenic virulence *S. aureus* strains from the inactivated whole surface antigens vaccine.

■ CONCLUSION

The inactivated *S. aureus* whole surface antigens vaccine give the protection to the experimental animals 100% against methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) homologous challenge which considered big issue for humans and animals and threat the public health.

■ REFERENCES

1. Khudor MH, Abbas BA, Idbeis HI. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. *Bas. J. Vet. Res.* 2012;11(1): 254–264.
2. Weese JS, van Duinkerken E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3–4):418–29. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039. Epub 2009 Feb 5.
3. Khudor MH. The influence of heavy metals and antimicrobial on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Basrah Journal of Veterinary Research.* 2010;9(2):22–38.
4. Santos GAC, Dropa M, Rocha SM, Peternella FAS, Razzolini MTP. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in drinking water fountains in urban parks. *J Water Health.* 2020 Oct;18(5):654–664. doi: 10.2166/wh.2020.042.
5. Idbeis HI, Khudor MH. Detection Of Intracellular Adhesion Gene (Icaa and Icad) and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Isolates From Mastitis Milk of Sheep and Goat. *Bas. J. Vet. Res.* 2019;18(2):306–327.
6. Khudaier BY, Anad IT, Abbas BA. Isolation of *Staphylococcus aureus* from buffalo milk in Basrah governorate and detection of their antibiotic susceptibility. *Basrah Journal of Veterinary Research.* 2014;1(1):1–11.
7. Zarfel G, Luxner J, Folli B, Leitner E, Feierl G, Kittinger C, Grisold A, Williamson DA, Coombs GW, Nimmo GR, Walter J, Haller S, Blank HP, Eckmanns T, Abu Sin M, Hermes J, Uhlemann AC, Otto M, Lowy FDD, Becker K. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013;7(3):1–12.
8. Algammal AM, Hetta HF, Elkeshish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, Batiha GE, El Nahhas N, Mabrok MA. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect Drug Resist.* 2020 Sep 22;13:3255–3265. doi: 10.2147/IDR.S272733.
9. Mohammed KAS, Abdulkareem ZH, Alzaalan AR, Yaqoob AK. Spa typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens from Outpatients in Iraq. *Pol J Microbiol.* 2021 Mar;70(1):79–85. doi: 10.33073/pjm-2021-007. Epub 2021 Mar 19.
10. Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs.* 2010 Sep-Oct;1(5):326–36. doi: 10.4161/bbug.1.5.12540.
11. Hajam IA, Dar PA, Won G, Lee JH. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet Res.* 2017 Jun 24;48(1):37. doi: 10.1186/s13567-017-0442-5.
12. Clegg J, Soldaini E, McLoughlin RM, Rittenhouse S, Bagnoli F, Phogat S. *Staphylococcus aureus* Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies. *Front Immunol.* 2021 Jul 7;12:705360. doi: 10.3389/fimmu.2021.705360.
13. Chen H, Ji H, Kong X, Lei P, Yang Q, Wu W, Jin L, Sun D. Bacterial Ghosts-Based Vaccine and Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 8;13(11):1892. doi: 10.3390/pharmaceutics13111892.
14. Paukner S, Kohl G, Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. *J Control Release.* 2004 Jan 8;94(1):63–74. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.09.010.
15. Lu YJ, Barreira-Silva P, Boyce S, Powers J, Cavallo K, Behar SM. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Rep.* 2021 Sep 14;36(11):109696. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109696.
16. Rockman MV, Hahn MW, Soranzo N, Goldstein DB, Wray GA. Positive selection on a human-specific transcription factor binding site regulating IL4 expression. *Curr Biol.* 2003 Dec 2;13(23):2118–23. doi: 10.1016/j.cub.2003.11.025.
17. Stowe CM. Comparative therapeutics in large domestic animals. *Fed Proc.* 1967 Jul-Aug;26(4):1244–6.
18. Gao C, Zhu L, Jin CC, Tong YX, Xiao AT, Zhang S. Proinflammatory cytokines are associated with prolonged viral RNA shedding in COVID-19 patients. *Clin Immunol.* 2020 Dec;221:108611. doi: 10.1016/j.clim.2020.108611. Epub 2020 Oct 14.
19. Vinod N, Oh S, Park HJ, Koo JM, Choi CW, Kim SC. Generation of a Novel *Staphylococcus aureus* Ghost Vaccine and Examination of Its Immunogenicity against Virulent Challenge in Rats. *Infect Immun.* 2015 Jul;83(7):2957–65. doi: 10.1128/IAI.00009-15. Epub 2015 May 11.

20. Jaber NN. Isolation and biotyping of *Staphylococcus aureus* from white cheese in basrah local markets. *Basrah Journal of Veterinary Research*. 2011;10(2):55–66.
21. Zuluaga A, Arango-Bustamante K, Caceres DH, Sánchez-Quitian ZA, Velásquez V, Gómez BL, Parra-Giraldo CM, Maldonado N, Cano LE, de Bedout C, Rivera RE. Concordance analysis between different methodologies used for identification of oral isolates of *Candida* species. *Colombia Medica*. 2018;49(3):1–8.
22. Ramandinianto SC, Khairullah AR, Effendi MH, Tyasningsih W, Rahmahani J. Detection of enterotoxin type B gene on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from raw milk in East Java, Indonesia. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020;11(7):1–7.
23. Wangai FK, Masika MM, Maritim MC, Seaton RA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in East Africa: red alert or red herring? *BMC Infect Dis*. 2019 Jul 9;19(1):596. doi: 10.1186/s12879-019-4245-3.
24. Hu M, Zhang Y, Xie F, Li G, Li J, Si W, Liu S, Hu S, Zhang Z, Shen N, Wang C. Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Jun;20(6):795–802. doi: 10.1128/CVI.00676-12. Epub 2013 Mar 27.
25. Park HJ, Oh S, Vinod N, Ji S, Noh HB, Koo JM, Lee SH, Kim SC, Lee KS, Choi CW. Characterization of Chemically-Induced Bacterial Ghosts (BGs) Using Sodium Hydroxide-Induced *Vibrio parahaemolyticus* Ghosts (VPGs). *Int J Mol Sci*. 2016 Nov 15;17(11):1904. doi: 10.3390/ijms17111904.
26. Moreau E, Meurens F. Interleukins and large domestic animals, a bibliometric analysis. *Heliyon*. 2017 Jun 15;3(6):e00321. doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00321.
27. Ahmed EB, Wang T, Daniels M, Alegre ML, Chong AS. IL-6 induced by *Staphylococcus aureus* infection prevents the induction of skin allograft acceptance in mice. *Am J Transplant*. 2011 May;11(5):936–46. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03476.x. Epub 2011 Mar 30.
28. Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, Fu Y, French SW, Edwards JE Jr, Spellberg B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog*. 2009 Dec;5(12):e1000703. doi: 10.1371/journal.ppat.1000703. Epub 2009 Dec 24.
29. Egecioglu E, Anesten F, Schéle E, Palsdottir V. Interleukin-6 is important for regulation of core body temperature during long-term cold exposure in mice. *Biomed Rep*. 2018 Sep;9(3):206–212. doi: 10.3892/br.2018.1118. Epub 2018 Jul 2.
30. Misra N, Wines TF, Knopp CL, McGuire MA, Tinker JK. Expression, immunogenicity and variation of iron-regulated surface protein A from bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 May 1;364(9):fnx082. doi: 10.1093/femsle/fnx082.
31. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med*. 1982 Mar 1;155(3):914–23. doi: 10.1084/jem.155.3.914.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.2.011>
УДК 616-074:577.212.3



Костюк С.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Секвенирование – технологическая часть получения первичных данных о последовательностях нуклеиновых кислот: особенности, которые следует учитывать при его осуществлении во избежание погрешностей в процедуре исследования

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 06.02.2024

Принята: 19.04.2024

Контакты: s.kostiuk@mail.ru

Резюме

Изобретение и внедрение в практику технологий высокопроизводительного секвенирования вывели на новый уровень такие направления науки, как генетика, молекулярная биология, и дали стимулы для становления персонализированной медицины. В настоящее время область сиквенс-анализа объединяет широкую гамму различных технологий, базирующихся на разных принципах и разработанных независимо. Правильное планирование научного эксперимента в медицине крайне важно. Перед началом работы исследователь обязан перечислить для себя все элементы исследования, способные исказить результаты, приложив максимальные усилия к уменьшению или устранению таких искажений. Ошибки и искажения поджидают исследователя на каждом из этапов секвенирования – от сбора биологических образцов до обработки файлов. В данной статье описаны технические особенности получения первичных данных о последовательностях нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: секвенирование, ДНК, РНК, молекулярная биология, ПЦР, первичные данные

Svetlana A. Kostiuk
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Sequencing is a Technological Part in Obtaining Primary Data on Nucleic Acid Sequences: Features to be Taken into Account when Performing it to Avoid Errors in the Test Procedure

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 06.02.2024
Accepted: 19.04.2024
Contacts: s.kostiuk@mail.ru

Abstract

Inventing and implementing high-throughput sequencing technologies brought to a new level such areas of science as genetics and molecular biology, and provided incentives for the development of personalized medicine. Today, the field of sequencing analysis includes a wide range of different technologies based on different principles and developed independently. Proper planning of a scientific experiment in medicine is extremely important. Before beginning a work, the researcher must list for himself or herself all elements of the study that could distort the results, making every effort to reduce or eliminate such distortions. Errors and distortions await the researcher at every stage of sequencing, from biological sampling to file processing. This article describes technical features of obtaining primary data on nucleic acid sequences.

Keywords: sequencing, DNA, RNA, molecular biology, PCR, primary data

Большинство современных методов молекулярной биологии предполагает использование множества идентичных макромолекул для получения детектируемого сигнала [1]. К ним относятся различные виды хроматографии, рентгеноструктурный анализ, масс-спектрометрия. Секвенирование ДНК также требует усиления сигнала за счет использования в анализе множества одинаковых молекул ДНК. Определение последовательности нуклеиновых кислот (НК) методами высокопроизводительного секвенирования представляет собой одновременное параллельное прочтение последовательности нескольких миллионов разных (относительно коротких) фрагментов исходной ДНК. Наиболее популярные на рынке технологии секвенирования не позволяют оценивать нуклеотидную последовательность непосредственно геномной или комплементарной ДНК и предполагают амплификацию исходных молекул [2, 3].

Перед загрузкой в секвенатор исследуемую ДНК необходимо модифицировать путем создания коллекции случайных фрагментов нужной структуры. Образец ДНК, определенным образом фрагментированный и амплифицированный, называют библиотекой случайных фрагментов ДНК для секвенирования. Если фрагменты при этом прикреплены к предметному стеклу или микрочастице, библиотеку называют иммобилизованной.



Общая последовательность этапов высокопроизводительного секвенирования для наиболее популярных платформ следующая [2, 3]:

- 1) разрушение ДНК с получением фрагментов определенной длины;
- 2) присоединение синтетических олигонуклеотидных адаптеров по краям фрагментов;
- 3) наработка (амплификация) каждого фрагмента ДНК в отдельном микрореакторе с микрочастицей (эмульсионная ПЦР) и/или непосредственно на поверхности предметного стекла (мостиковая ПЦР);
- 4) определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК;
- 5) биоинформатический анализ данных – коротких прочтений.

Приготовление библиотеки фрагментов происходит на первых трех этапах и определяет 90% успеха сиквенсного проекта. В настоящее время в высокопроизводительном секвенировании используют два основных типа библиотек фрагментов ДНК: обычную и инвертированную. Во избежание путаницы отметим, что производители наборов реагентов для конструирования библиотек выделяют гораздо больше типов библиотек, например, разделяя их по виду стартового материала или числу и направлению прочтений, однако такое деление не несет под собой научного обоснования и является маркетинговым приемом.

Исходным материалом для исследования могут служить любые НК: ДНК всех типов, РНК всех типов, включая микроРНК, продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР), отдельные области генома (таргетное секвенирование), комплексы нуклеиновых кислот с белками и т. д. Несмотря на различие в целях и задачах экспериментов, создание библиотеки для высокопроизводительного секвенирования в итоге сводится к разрушению ДНК до фрагментов определенного размера или отбору определенной фракции из существующего спектра фрагментов, лигированию адаптеров и увеличению количества ДНК одним из методов наработки *in vitro* (амплификации), отбору фракции фрагментов определенной длины, нанесению на твердую фазу и т. п. [1–3].

В случае исследования РНК первым этапом после очистки от примесей является обратная транскрипция, то есть создание комплементарной ДНК, и далее продолжают подготовку библиотеки, как для ДНК. Следовательно, метод очистки РНК должен эффективно удалять из биологического образца примеси, способные помешать работе ревертазы [4, 5]. Если же предполагается секвенирование генома, чувствительным к примесям этапом может стать ферментативное разрушение ДНК или этап лигирования адаптеров, если разрушение ДНК выполнялось физическими методами.

Все современные методы очистки нуклеиновых кислот можно глобально разделить на две группы: методы с поэтапным удалением примесей из водного раствора НК и методы, основанные на сорбции НК на твердой фазе. Наиболее известной методикой первого типа является фенол-хлороформная экстракция [1, 6]. Вторая группа методик основана на использовании силикатных сорбентов, эффективно связывающих НК в растворе с высокой ионной силой. Одной из первых появившихся методик такого типа является метод выделения ДНК, предложенный Boom R. с соавторами [7]. Эта технология основана на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента гуанидина тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на твердом носителе. После промывки сорбента на нем фиксируется чистый образец НК, легко снимающийся дистиллированной водой. В последнее время чрезвычайно

распространены одноразовые пластиковые микроколоники с упакованным в них сорбентом, например, наборы реагентов фирм QIAGEN, Ambion и др. Промывка колонок растворами с высокой ионной силой удаляет белки и низкомолекулярные соединения, после чего проводят элюцию очищенных НК раствором с низкой ионной силой.

Концентрацию полученных препаратов ДНК или РНК перед обратной транскрипцией можно измерить непосредственно по спектру поглощения нуклеиновых кислот на спектрофотометре, по флуоресценции интеркалирующего красителя после электрофореза или при помощи флуориметра, а также методом количественной ПЦР в режиме реального времени [1, 4, 5].

Производители оборудования для секвенирования рекомендуют осуществлять измерение с помощью компактных флуориметров типа Qubit от Life Technologies или Quantus от Promega. Принцип их действия основан на измерении флуоресценции интеркалирующего в ДНК красителя типа SYBR. Точность измерения обеспечивается калибровкой прибора с помощью двух стандартов перед каждой серией измерений. Преимущество флуоресцентного определения концентрации перед спектрофотометрическим с помощью довольно распространенных приборов типа Nanodrop заключается в гораздо более широком диапазоне концентраций и более точных результатах.

Метод количественной ПЦР в режиме реального времени как способ определения концентрации ДНК несколько сложнее и дольше в исполнении, но дает гораздо более точные и воспроизводимые результаты в огромном линейном диапазоне значений. Если стартовым материалом является геномная ДНК, можно использовать праймеры на уникальный регион, представленный в геноме один раз, если это комплементарная ДНК, то можно оценивать количество одного или двух средне- или низкопредставленных транскриптов. Праймеры желательно располагать близко, оставляя место для олигонуклеотидной пробы типа TaqMan [1, 4, 5].

Отдельно следует упомянуть ситуацию, когда по каким-либо причинам невозможно получить достаточное стартовое количество ДНК или комплементарной ДНК, например, в случае если недостаточно биологического материала и проводится исследование единичных клеток. В этой ситуации можно перед началом создания библиотеки фрагментов амплифицировать НК одним из стандартных способов. При наличии малого количества геномной ДНК возможно прибегнуть к методике полногеномной амплификации, основанной на изотермическом синтезе ДНК [8]. Если работа начинается с малого количества РНК, можно использовать амплификацию комплементарной ДНК [9]. Важно при использовании предварительной амплификации ДНК или комплементарной ДНК в проектах секвенирования помнить об искажениях, которые неизбежно вносит этот прием.

Фрагментировать ДНК можно физическими или ферментатическими способами. В ряде случаев, например, если стартовым материалом служат микроРНК или короткие продукты ПЦР, этап разрушения не требуется, однако может потребоваться этап отбора фракции фрагментов нужной длины. Физически ДНК можно фрагментировать ультразвуком, процесс называют соникацией, пропусканием через микротверждение – небулизацией, гидродинамическим воздействием – гидроширингом. К преимуществам физических методов перед ферментатическими можно отнести хорошую воспроизводимость результатов, поскольку они создают стабильный диапазон длин получаемых фрагментов даже для разного по качеству стартового материала,



а также низкую зависимость от последовательности. Энзиматические методы расщепления ДНК предполагают использование различных эндонуклеаз, при этом наборы реагентов для энзиматического расщепления представлены на рынке как производителями платформ для секвенирования, так и биотехнологическими компаниями, предлагающими альтернативные, более дешевые решения для приготовления библиотек. Чаще всего для расщепления ДНК используют смеси модифицированных нуклеаз – типа эндонуклеазы T7 и нуклеазы из *Vibrio vulnificus*, а также транспозаз [2, 3].

Постановка ферментативной реакции не требует больших трудозатрат, протокол легко можно оптимизировать под особенности каждого типа разрушаемой ДНК и ожидаемых длин фрагментов в любом диапазоне значений. Данный подход заключается в подборе периода обработки нуклеазами и температуры реакции: чем короче фрагменты нужно получить, тем дольше проводят реакцию. Следует отметить, что правильно расщепленная ДНК представляет собой набор фрагментов, длина которых распределена по закону Гаусса с максимумом в требуемом диапазоне значений. В случае, если ДНК «перефрагментирована» или «недофрагментирована», можно, несмотря на отличные аппаратные показатели секвенирования, при биоинформатическом анализе получить неинформативные данные, так как значительная часть ДНК окажется вне оптимума размеров.

Некоторые технологии создания библиотек используют отбор фракций нужной длины сразу после расщепления ДНК: чаще – для инвертированных библиотек; другие берут в лигирование весь спектр фрагментов. К преимуществам ферментативного разрушения ДНК перед физическими методами можно отнести образование однотипных концов необходимой структуры, по которым и проводится присоединение сиквенсных адаптеров, тогда как физически разрушенная ДНК требует ферментативной обработки концов. После каждой ферментативной реакции необходимо проводить очистку от фермента и иных компонентов реакции спиртовым осаждением ДНК или сорбентными методами, что всегда сопряжено с потерями исследуемого биологического материала [2, 3].

Наиболее распространенным способом оценки длины фрагментированной ДНК является метод электрофореза в геле. Для этого может использоваться как обычный электрофорез в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием, так и готовые аппаратные решения, например, с использованием электрофореза в микрокапиллярах на небольшой пластиковой подложке. После получения фрагментов ДНК желаемого размера путем подбора условий разрушения ДНК или непосредственно отбором оптимальной фракции фрагментов выполняют лигирование адаптеров, с которых будет осуществляться амплификация библиотеки и ее секвенирование [1].

Во всех коммерчески доступных технологиях высокопроизводительного секвенирования к фрагментам присоединяют два разных адаптера, причем в секвенировании будут использованы только фрагменты ДНК, несущие по концам разные адаптеры, поскольку фрагменты с одним адаптером не будут амплифицированы из-за эффекта супрессии ПЦР [10, 11].

На этапе лигирования важно выдержать соотношение между концентрацией адаптеров и фрагментированной ДНК для того, чтобы лигирование прошло эффективно. Косвенным признаком эффективности присоединения адаптеров является количество циклов ПЦР с праймерами, отжигающимися на адаптерах, необходимое для получения детектируемого продукта реакции [2, 3].

Этап предварительной амплификации библиотеки требуется в том случае, если количество исходной ДНК гораздо ниже рекомендуемого. Сложность любой амплификации ДНК *in vitro* заключается в неизбежном искажении исходной представленности фрагментов. В случае ПЦР искажение происходит вследствие разной эффективности амплификации для разных по длине и последовательности фрагментов ДНК, поэтому количество циклов при амплификации библиотеки должно быть минимальным, не превышающим 13–15 циклов [4, 5]. Большее количество циклов ПЦР для образцов геномной или комплементарной ДНК ведет к снижению сложности смеси фрагментов ДНК и потере некоторых последовательностей из библиотеки, что значительно искажает результаты секвенирования.

На следующем технологическом этапе производят отбор фракций нужной длины фрагментов библиотеки, что существенно повышает эффективность ее секвенирования, поскольку более короткие фрагменты в сравнении с оптимальными дают слишком короткие прочтения, а более длинные фрагменты искажают результаты измерений и подбор соотношений для оптимального сиквенс-анализа [2, 3]. Для отбора нужной фракции библиотеки исследователь может использовать как обычный электрофорез в агарозном геле, так и аппаратные решения разных производителей, в том числе и на основе гель-электрофореза.

Во всех случаях осуществляют разделение библиотеки ДНК в геле вместе с маркером длин, например, с шагом в 50 п. н. на одной из дорожек, а затем вырезают из геля фракцию нужной длины. Самым дешевым способом является обычный агарозный гель-электрофорез с вырезанием участка геля при помощи скальпеля и элюцией из него ДНК набором реагентов для экстракции из геля. К недостаткам данного метода можно отнести низкую устойчивость к ошибкам лаборанта и высокую вероятность кросс-контаминации, связанную с многократным использованием камеры для электрофореза, заливочного столика, гребенок и т. д. [1–3].

Более предпочтительными для отбора определенной фракции фрагментов ДНК являются специализированные системы, работающие на картриджных гелях. Система позволяет визуализировать гель-электрофорез непосредственно во время его прохождения. Элюция нужной фракции осуществляется из специальных лунок, расположенных в конце геля, которые исследователь заполняет дистиллятом или трис-ЭДТА-буфером [2, 3].

Поскольку технологии секвенирования весьма производительны, часто исследуемый образец не требует столь высокого объема данных на выходе, поэтому для экономии средств можно смешать несколько исследуемых образцов и секвенировать их вместе, в ходе одной процедуры. Если ДНК предварительно пометить образец-специфичными адаптерами, секвенируемыми вместе с уникальной частью фрагментов ДНК, биоинформатический анализ полученных прочтений позволяет разделить данные от разных биологических образцов. Такой подход получил название «штрихкодирования» (или «бар-кодирования»), по аналогии с широко используемыми в маркировке товаров уникальными метками штрихкодами (barcodes).

Пример рационального использования «штрихкодов» – секвенирование экзона человека, который составляет около 1% от гаплоидного генома размером 3 млрд п. н., на платформе SOLiD 5500, использующей одну проточную камеру с шестью дорожками, с каждой из них получается около 24 млрд п. н. Наносить на одну дорожку с такой производительностью один образец экзона экономически неоправданно.



Рациональнее пометить уникальным образом несколько разных образцов, смешать их эквимольно и провести одновременное секвенирование, а результаты разделить уже биоинформатически на основании наличия в каждом прочтении специфичной метки. Метки представляют собой короткие около 10 п. н. последовательности, которые также прочитываются в процессе секвенирования. Их присоединяют к фрагментам ДНК на стадии конструирования библиотеки при лигировании сиквенсных адаптеров к фрагментам ДНК. Таким образом, «штрихкод» представляет собой участок адаптера для секвенирования, расположенный после участка отжига праймера, с которого начинается сиквенс-анализ. Как правило, для разных образцов используют один и тот же адаптер 1, отжигающийся на микросферах для проведения эмульсионной ПЦР, и набор адаптеров 2, отличающихся штрихкодированными участками.

Важным условием проведения эффективного секвенирования для всех образцов, внесенных в одну реакцию, является их эквимольное смешивание, что обеспечит равномерную представленность прочтений для каждого образца [2, 3]. На это стоит обратить особое внимание: нужно очень аккуратно измерить концентрацию каждой библиотеки перед смешиванием, для этого можно использовать метод ПЦР в реальном времени, который обладает более высокой точностью.

Ключевым элементом большинства технологий высокопроизводительного секвенирования является одновременная наработка множества разных по последовательности фрагментов ДНК так, чтобы получаемые ампликоны были локализованы вместе на одной микросфере или в одной точке на поверхности. Существует два метода такого ПЦР-клонирования: мостиковая ПЦР и эмульсионная ПЦР.

Большинство технологий секвенирования следующего поколения недостаточно чувствительны, чтобы регистрировать сигнал от единичной молекулы ДНК, и требуют применения клонирования *in vitro*: способа ферментативной наработки отдельных молекул ДНК с получением изолированных друг от друга пулов идентичных фрагментов. Простейшим способом клонирования фрагментов ДНК *in vitro* может быть обычная ПЦР [11]. Таким образом, все наработанные в данной пробирке фрагменты будут клонами единственной молекулы.

На принципе амплификации фланкированных адаптерами отдельных фрагментов ДНК основано множество молекулярных технологий [9, 12], например, мостиковая ПЦР (bridge PCR) [13]. Принцип этой технологии заключается в проведении ПЦР с праймерами, прикрепленными к твердой фазе или подложке. С пришитого к поверхности праймера синтезируется фрагмент ДНК, после этапа денатурации фрагмент снова взаимодействует с праймером на поверхности в пределах доступности по длине фрагмента, образуя дугу (мостик) между двумя точками на подложке, при повторении циклов ПЦР из точки синтеза первого фрагмента колония фрагментов ДНК будет быстро увеличиваться. Создание клональной библиотеки фрагментов ДНК методом мостиковой ПЦР используется в технологии компании Illumina.

Эмульсионная ПЦР (emulsion PCR, ePCR) представляет собой другой распространенный вариант клонирования фрагментов ДНК *in vitro*. Эта методика позволяет амплифицировать ДНК на покрытых праймерами микросферах таким образом, что каждая микросфера оказывается окружена только одним типом фрагментов. Для этого создают библиотеку фрагментов ДНК с адаптерами по концам, а затем смешивают полученные фрагменты с покрытыми праймерами микросферами, свободным

праймером и другими необходимыми для ПЦР компонентами в условиях мелкодисперсной водно-масляной эмульсии так, чтобы в каждую микрокаплю воды попали в среднем одна микросфера и один исходный матричный фрагмент ДНК. В ходе ПЦР праймеры на микросфере иницируют синтез фрагментов, начиная с единственной мишени, а с праймера в растворе достраивается вторая цепь. В итоге реакции получают миллионы микросфер, каждая из которых несет миллионы идентичных фрагментов ДНК [12, 13].

Для оценки качества библиотеки после эмульсионной ПЦР исходят из правила, что соотношение сработавших микросфер и несработавших должно быть 30%:70%. Большой процент сработавших микросфер указывает на их высокую поликлональность. Оценить процент сработавших микросфер возможно путем измерения флуоресценции несущих ДНК микросфер относительно несработавших. После эмульсионной ПЦР проводят обогащение фракции сработавших микросфер, например, за счет гибридизации с магнитными частицами, несущими стрептавидин. При этом сработавшие микросферы в этом случае должны нести биотин на дистальном адаптере.

Многие пользователи считают эмульсионную ПЦР трудоемкой и весьма нестабильной. Действительно, в первых вариантах секвенирования эмульсию приходилось готовить вручную, и малейшие отклонения в технологии приводили к разрушению всей эмульсии. В настоящее время разработаны автоматизированные подходы к проведению эмульсионной ПЦР, например, с помощью приборов серии OneTouch. В 2013 году для платформ Ion Torrent появился полностью автоматический аппарат для пробоподготовки Ion Chef, выполняющий эмульсионную ПЦР, обогащение и загрузку чипа в автоматическом режиме. На методе эмульсионной ПЦР базируются технологии секвенирования 454 Life Sciences (Roche), Ion PGM и Ion Proton (Life Technologies), Polonator (Dover/Harvard), SOLiD (Life Technologies).

Если используемая технология высокопроизводительного секвенирования предполагает прочтение каждого фрагмента библиотеки с двух сторон, существенным отличием этих библиотек является расстояние по исходной ДНК между получаемыми в результате секвенирования одного фрагмента последовательностями. Для обычной библиотеки это расстояние соответствует физической длине фрагмента и, как правило, не превышает 2–3 т. п. н., для инвертированной библиотеки это могут быть и десятки тысяч пар нуклеотидов. В процессе секвенирования обычная библиотека может быть прочитана как в одном направлении, так и в обоих. Платформы на технологиях Ion Torrent и 454 Life Sciences в настоящее время позволяют проводить только однонаправленное секвенирование фрагментов с дистального по отношению к микросфере адаптера. Для Ion Torrent показана возможность по окончании сиквенса в одном направлении провести денатурацию библиотеки ДНК прямо в чипе и «смыть» синтезированную фракцию ДНК, а затем провести секвенирование тех же фрагментов, расположенных в тех же микрореакторах, в противоположном направлении.

Технологии Illumina и SOLiD позволяют осуществлять секвенирование фрагмента с двух сторон. После прочтения с одного из адаптеров проводят чтение в обратном направлении с праймера, комплементарного адаптеру на противоположном конце. Чтение с двух сторон хорошо тем, что это позволяет значительно повысить объем данных с одной библиотеки и, в случае перекрывания прочтений, их общую длину, при отсутствии перекрывания дает примерное расположение прочтений друг относительно друга. При этом качество сигнала быстро падает от начала секвенирования



к концу фрагмента, так что прочтение короткого фрагмента с двух сторон насквозь позволяет компенсировать низкое качество прочтения [14].

Более трудоемкой в изготовлении, но крайне полезной в случае полногеномного секвенирования, особенно *de novo*, и для некоторых других задач является инвертированная библиотека. Суть подхода состоит в том, что в один фрагмент для секвенирования попадают два участка исходной ДНК, расстояние между которыми примерно известно, причем в зависимости от задачи можно регулировать удаленность попадающих в совместный сиквенс фрагментов генома от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов [15]. Преимущество инвертированных библиотек в первую очередь определяется тем, что ввиду короткой длины прочтений за одно прочтение не удастся насквозь пройти участки многочисленных повторов, дубликаций и других повторяющихся элементов генома, тем самым сборка прочтений в более длинные затруднена или даже невозможна. Парное прочтение инвертированной библиотеки дает информацию о расположении двух прочтений относительно друг друга, что можно использовать для сборки геномов на повторяющихся последовательностях.

Помимо инвертированных библиотек, прочитанных с двух сторон, информацию о расположении контигов в геноме можно получить и на основании сравнения с уже собранными геномами генетически близких видов, однако нужно помнить, что такие допущения необходимо подтверждать экспериментально из-за часто встречающихся даже для близких таксонов крупных перестроек в геномах.

Безусловно, получением первичных данных секвенирование не заканчивается, а скорее только начинается. Автоматический секвенатор дает миллионы коротких прочтений, которые необходимо собрать в более длинные последовательности и провести их биоинформатический анализ. К сожалению, в настоящее время ни одна из технологий секвенирования не позволяет определять последовательность генома непрерывно на протяжении многих миллионов пар геномной ДНК. Все технологии предполагают фрагментирование ДНК и дают в результате сравнительно короткие, но перекрывающиеся участки последовательности длиной 50–1000 п. н., поэтому в случае определения генома какого-либо организма впервые возникает необходимость его сборки, определения полной последовательности по огромному набору фрагментов.

К сожалению, на практике исследователь всегда имеет дело с данными, в которых присутствуют ошибки секвенирования, существенно усложняющие и без того непростую задачу по сборке *de novo*. Для частичного устранения ошибок секвенирования полученные данные предварительно обрабатывают. Кроме последовательности нуклеотидов, приборы для секвенирования выдают данные о качестве прочтения каждой буквы, отбрасывая данные, имеющие низкое качество, можно значительно сократить количество ошибок. Большинство программ для сборки геномов позволяют проводить такую фильтрацию, для тех же, где она не предусмотрена, желательно провести ее самостоятельно перед сборкой.

Существует еще одна распространенная проблема – повторяющиеся последовательности, присутствующие в любом геноме: это повторы, превышающие длину одного прочтения для использованной технологии секвенирования, что требует существенного увеличения необходимого объема аппаратной памяти для хранения информации о связях.

Несмотря на огромный поток экспериментов по секвенированию геномов и широкий спектр методических приемов, на сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос, какие комбинации технологий секвенирования и программ для сборки дают наилучшие результаты при секвенировании *de novo*. Нет и единых критериев оценки качества сборки.

Любой научный эксперимент требует тщательной предварительной подготовки. В медицинской науке планирование экспериментальной части исследования имеет большое значение по причине широкой вариабельности свойств, характерной для биологических объектов. Эта особенность также является причиной трудностей при интерпретации результатов, которые могут значительно различаться от опыта к опыту [16].

Известно, что геномы двух организмов одного и того же вида, как правило, не являются полностью идентичными. Наиболее частыми различиями в близкородственных геномах являются однонуклеотидные вариации отличия ДНК по нуклеотиду в определенной позиции, дающие так называемый внутривидовой однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP), являющийся основной причиной существования аллелей [17]. Наряду с SNP часто встречаются вставки или делеции одного нуклеотида. Более протяженные вставки или делеции обычно называют вариацией числа копий региона, они могут быть разной протяженности: от нескольких нуклеотидов до целой хромосомы. Отклонение числа хромосом от нормального называют анеупloidией. Кроме того, возможны инверсии изменения структуры хромосомы, вызванные разворотом одного из ее участков на 180°, и транслокации – перенос участка хромосомы в новое место. Все эти изменения можно обнаружить с помощью высокопроизводительного секвенирования, как правило, в варианте повторного секвенирования генома.

Ряд биологических задач предполагает повторное определение последовательности ДНК вида организмов, геном которого уже есть в базе данных. Для прокариот это может быть секвенирование отличающихся определенными свойствами – патогенностью, продуктивностью – штаммов микроорганизма. Для эукариот – накопление данных о вариабельности генома внутри вида, ассоциативные исследования, в том числе поиск генетических детерминант определенных фенотипов [17].

Если перед исследователем стоит задача определения последовательности генома организма, данные для которого уже есть в базе данных, то есть стоит задача повторного секвенирования, ресеквенирования, ее решение существенно упрощается. В этом случае проводят сравнение полученных данных с референсным геномом, и от качества такого сравнения зависят результаты дальнейшего анализа данных.

Для сравнения полученных данных геномного секвенирования с уже имеющимися полными геномами совсем не обязательно собирать геном заново, достаточно выровнять (картировать) прочтения на уже имеющуюся референсную последовательность. Несмотря на то, что задача выравнивания на референсный геном намного проще, чем сборка *de novo*, и здесь существует ряд трудностей. Во-первых, даже для сравнительно небольшого генома бактерии – 5 млн п. н. – для каждого фрагмента в ходе выравнивания необходимо проверить 5 млн возможных вариантов расположения этого участка на геноме. Но в референсном геноме могут быть и небольшие отличия – однонуклеотидные замены, делеции или вставки. Если разрешить алго-



ритму позиционировать последовательность с учетом наличия единственного несовпадающего нуклеотида на 100 п. н., то мы получим $3 \times 100 \times 5\,000\,000$ вариантов расположения фрагмента на референсном геноме, то есть для каждого прочтения нужно выполнить уже 1,5 млрд сравнений. Если предположить наличие делеции или вставки, количество сравнений возрастет еще больше. Для современных персональных ЭВМ решение по выравниванию бактериального генома на референсный геном занимает около двух часов. В целом задачу картирования прочтений на референсном геноме можно сформулировать следующим образом: даны набор полученных в эксперименте последовательностей Q , набор референсных последовательностей R , набор ограничений и пороговое значение дистанции k . Необходимо найти все подстроки t в R , удовлетворяющие всем ограничениям, в том числе и такому, что расстояние между t и любой последовательностью q из Q не превышает A' , то есть $d(q, t) < k$, где $d(q, t)$ – функция расстояния. Ее обычно рассчитывают на основании количества замен, делений или вставок. Также она может учитывать протяженность делений или вставок и характерные ошибки использованной платформы секвенирования. Основная цель картирования – найти правильное расположение в геноме каждой последовательности q из Q с учетом ошибок секвенирования и структурных вариантов. При этом важно отличать ошибки секвенирования от реальных различий в сравниваемых последовательностях.

Однако технологии высокопроизводительного секвенирования дают на порядки больший объем данных, и методы, успешно применявшиеся для сенгеровского секвенирования, оказываются недостаточно эффективны для работы с большими массивами данных [2, 3]. Поэтому были разработаны новые алгоритмы, требующие меньше аппаратной мощности и времени на выполнение. Число программ для картирования прочтений уже превысило полсотни и постоянно растет. Выбирая подходящую программу для картирования прочтений, нужно учитывать, для каких данных и каких задач создавалась та или иная программа (ДНК, РНК, микроРНК, изучение паттерна метилирования ДНК посредством обработки ее бисульфитом или паттерна расположения ДНК-связывающих белков после иммунопреципитации хроматина и т. д.). Кроме того, некоторые программы разработаны специально для работы с данными конкретной технологической платформы для секвенирования и учитывают характерные особенности или ошибки именно этой платформы, например, прочтение гомополимерных участков для Ion Torrent и 454 Life Sciences, одонуклеотидные замены и ухудшение качества данных к концу прочтений для Illumina и особенности формата данных, цветовое кодирование для данных SOLiD.

Если в ходе анализа генома обнаружена новая вариация, возникает вопрос, какое биологическое значение она может иметь. Конечно, без экспериментальных данных биоинформатические подходы «сказать» что-то наверняка не могут, но могут дать направление для дальнейшего поиска.

Для этих целей разработаны инструменты, позволяющие на основании информации о месте расположения вариации сделать предположение о ее возможной биологической роли. Такие программные продукты позволяют определить, находится ли вариабельная позиция в кодирующей последовательности регуляторной области, в области некодирующей РНК и т. д. Если вариация обнаружена в кодирующей последовательности, то является ли она значимой, приводит ли к замене аминокислоты, влияет ли на рамку считывания и т. д.

Таким образом, любой лабораторный эксперимент в науке требует тщательной предварительной подготовки. В медицинской биологии планирование экспериментальной части исследования имеет большое значение по причине широкой вариативности свойств, характерной для биологических объектов. Эта особенность является основной причиной трудностей при интерпретации результатов, которые могут значительно различаться от опыта к опыту. Правильное планирование эксперимента в биологии крайне важно. Поэтому перед началом работы исследователь обязан перечислить для себя все элементы исследования, способные исказить результаты, приложив максимальные усилия к уменьшению или устранению таких искажений, лежащих в основе возникновения ошибок в процедуре исследования.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kostiuik S. *Molecular biological methods in medicine*. Minsk: Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education. 2013; 327 p. (in Russian)
2. Kostiuik S. Sequencing – methods for deciphering the nucleotide sequence of DNA. Message 1. *Meditsinskie novosti*. 2017;6:18–21. (in Russian)
3. Kostiuik S. Sequencing – methods for deciphering the nucleotide sequence of DNA. Message 2. *Meditsinskie novosti*. 2017;7:11–14. (in Russian)
4. Kostiuik S., Poluyan O. Molecular biological factors influencing the diagnostic reliability of laboratory test results based on PCR analysis technologies. Message I. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2020;3(9):314–323. (in Russian)
5. Kostiuik S., Poluyan O. Molecular biological factors influencing the diagnostic reliability of laboratory test results based on PCR analysis technologies. Message II. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2020;4(9):366–374. (in Russian)
6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156–159.
7. Boom R. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alphacasein to silica particles. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37:615–619.
8. Zhang L. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1992;89(13):5847–5851.
9. Lukyanov K. Construction of cDNA libraries from small amounts of total RNA using the suppression PCR effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;230(2):285–288.
10. Bankevich A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;9(5):455–477.
11. Lukyanov K.A. Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: an approach to in vitro cloning. *Nucleic Acids Research*. 1996;24(11):2194–2195.
12. Rebrikov D.V. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(20):90.
13. Dressman D. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2003;100:8817–8822.
14. Williams R. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nature methods*. 2006;3(7):545–550.
15. Akoiuitz A., Manuelidis L. A novel cDNA/PCR strategy for efficient cloning of small amounts of undefined RNA. *Gene*. 1989;81(2):295–330.
16. Kostiuik S. Laboratory errors and risk management in the molecular genetic laboratory. *Medical news*. 2021;1:6–10. (in Russian)
17. Kostiuik S. Predisposition genes for multifactorial diseases and genetic polymorphism: what is it? *Medical news*. 2020;7:45–49. (in Russian)



V ЮБИЛЕЙНЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

ЛАБРИН'24

Лабораторные Технологии в Репродуктивной Медицине
и Неонатологии: от науки к практике

Осень 2024 года, Москва

Организаторы



Министерство
здравоохранения
Российской Федерации



ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И.Кулакова»
Минздрава России

При поддержке



ФГБНУ «НИИ АГиР
им. Д.О. Отта»



ФГАОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова
Минздрава России



ФГБОУ ДПО
РМАНПО
Минздрава России



LABRIN.PRO