

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК TTV В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ



В. М. Семенов, С. К. Егоров, И. А. Лятос, Т. И. Дмитраченко, А. А. Марченко, М. С. Косова, С. К. Зенькова, К. А. Савочкина

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Введение. Исследование биологического материала на наличие ДНК TTV методом ПЦР позволяет своевременно оценить функциональное состояние печени и иммунной системы человека.

Цель исследования – создание компонентов для проведения ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ДНК TTV в биологическом материале.

Материал и методы. Проведены конструирование и подбор оптимальных праймеров и зондов с учетом размера (длины) ампликона, температуры отжига, нуклеотидного состава, распределения нуклеотидов по длине праймера, длины праймеров; возможности образования праймерами шпилек и димеров определяли с помощью программ Primer-BLAST/Primer3, FastPCR. Поскольку праймеры, даже абсолютно уникальные для тех или иных последовательностей ДНК, могли отжигаться и на неспецифичных участках, не относящихся к анализируемому гену, нами выполнялась проверка соответствия праймеров последовательностям целевого гена. С этой целью использовали online сервис NCBI Primer BLAST и оценивали локальное попарное выравнивание каждого из праймеров со всеми нуклеотидными последовательностями баз данных Refseq.

Результаты. В результате проведенных исследований по подбору оптимальной температуры отжига праймеров, концентраций праймеров, а также подбору оптимальной пары нуклеотидов были определены основные параметры сконструированных праймеров.

Выводы. Создан набор для обнаружения и количественной оценки ДНК TTV методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, который стал основой для разработки коммерческой тест-системы.

Ключевые слова: ДНК TTV, ПЦР, праймеры.

REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR TTV DNA DETECTION IN BIOLOGICAL MATERIAL

V. M. Semenov, S. K. Yahorau, I. A. Lyatos, T. I. Dmitrachenko, A. A. Marchenko, M. S. Kosova, S. K. Zenkova, K. A. Savochkina

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

Background. The study of biological material for the presence of TTV DNA using the PCR method allows for a timely assessment of the functional state of the human liver and immune system.

Objective. To develop components for real-time PCR for TTV DNA detection in biological material.

Material and methods. The design and selection of optimal primers and probes (taking into account the size (length) of the amplicon, annealing temperature, nucleotide composition, distribution of nucleotides along the length of the primer, length of primers, the possibility of formation of hairpins and dimers by primers) were performed using the Primer-BLAST/Primer3, FastPCR programs. Since primers, even absolutely unique for certain DNA sequences, could anneal at nonspecific sites, not related to the gene analyzed, we checked the correspondence of the primers to the sequences of the target gene. For this purpose, we used the NCBI Primer BLAST online service and assessed the local pairwise alignment of each primer with all nucleotide sequences of the Refseq databases.

Results. As the result of studies carried out on the selection of the optimal primer annealing temperature, primer concentrations, as well as the selection of the optimal nucleotide pair, the main parameters of the designed primers were determined.

Conclusions. A kit for the detection and quantification of TTV DNA using the polymerase chain reaction method with hybridization-fluorescent detection in real time was created and became the basis for the development of a commercial test system.

Keywords: TTV DNA, PCR, primers.

Автор, ответственный за переписку

Лятос Игорь Александрович, канд. мед. наук, доц., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: ialjatos@gmail.com

Corresponding author:

Lyatos Igor A., PhD (Medicine), Associate Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: ialjatos@gmail.com

Для цитирования: Для цитирования: Тест-система для проведения ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ДНК ТТВ в биологическом материале / В. М. Семенов, С. К. Егоров, И. А. Лятос, Т. И. Дмитраченко, А. А. Марченко, М. С. Косова, С. К. Зенькова, К. А. Савочкина // Гепатология и гастроэнтерология. 2024. Т. 8, № 1. С. 36-41. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-1-36-41>.

For citation: Semenov VM, Yadorau SK, Lyatos IA, Dmitrachenko TI, Marchenko AA, Kosova MS, Zenkova SK, Savochkina KA. Real-time PCR test system for detecting TTV DNA in biological material. *Hepatology and Gastroenterology*. 2024;8(1):36-41. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-1-36-41>.

Введение

Torque teno virus (TTV) впервые был выделен в 1997 г. группой японских ученых при исследовании сывороток крови пациентов с посттрансфузионным гепатитом, не имеющих маркеров известных парентеральных гепатитов, первоначально изучался как возможное дополнение к списку вирусов, их вызывающих. Однако гипотеза о том, что ТТВ может быть важной причиной криптогенного гепатита, не получила четкого подтверждения, хотя возможность ТТВ вызывать поражение печени при определенных обстоятельствах не исключена. Вскоре после открытия вируса стало очевидно, что ТТВ часто встречается как у здоровых, так и у больных людей [1].

Геном ТТВ представляет собой ковалентно замкнутую одноцепочечную кольцевую ДНК размером от 3,5 до 3,8 кб, имеющую ряд особенностей, характерных для цирковированных животных. Вирусная частица ТТВ имеет диаметр от 30 до 32 нм, при этом лишена внешней липидной оболочки, что обеспечивает устойчивость вируса к инаktivации химическими и физическими агентами [1, 2].

Для ТТВ характерен высокий уровень разнообразия нуклеотидных последовательностей. Чрезвычайно высокая степень полиморфизма ДНК служит основанием для разделения изолятов ТТВ на большое количество генотипов или видов. Разные генотипы ТТВ формируют пять отдельных филогенетических групп (G1-G5), разница в их нуклеотидной последовательности составляет более 40%. Вирусы, имеющие менее значимые различия в нуклеотидных последовательностях (11-30%), относят к генотипам, число которых в настоящее время насчитывает более 30, а по отдельным данным – более 50. Число генотипов постоянно увеличивается с внедрением новых молекулярно-генетических методов, обладающих все большей чувствительностью [3, 4].

Отдельные генотипы ТТВ заметно различаются по распространению [5, 6]. Существуют ли между генотипами биологические или патогенные различия, неизвестно. Однако есть предположение, что разные генетические варианты различаются и антигенно. Кроме того, имеющаяся генетическая гетерогенность ТТВ ограничивает чувствительность многих используемых для выявления вируса ПЦР-методов. Кодированная область генома ТТВ содержит не менее четырех открытых рамок считывания (ORF), одна из которых включает три гипервариабельных участка.

Нетранслируемая область (UTR) не различается у разных генотипов вируса и представляет собой мишень для ПЦР детекции. Подобно другим вирусам с кольцевым геномом, репликация ТТВ осуществляется по катящемуся кругу и сопровождается лизисом инфицированных клеток [3].

Пока точно не установлено, в каких клетках происходит репликация ТТВ, хотя известно, что основным источником ТТВ в периферической крови – Т-лимфоциты. Помимо клеток крови, ТТВ, как предполагается, может быть обнаружен практически во всех тканях и жидкостях и, вероятно, является пантропным. Подтверждением тому служит обнаружение ДНК ТТВ с достаточно высокой вирусной нагрузкой в грудном молоке, респираторном секрете, слюне, однако полный спектр клеток, поддерживающих репликацию ТТВ в организме, неизвестен [3, 7].

Точное понимание того, как и насколько иммунитет модулирует репликацию ТТВ, чрезвычайно важно для использования ПЦР-мониторинга ТТВ-виремии в качестве способа оценки иммунной функции. ПЦР на ТТВ успешно используется в ретроспективных и проспективных исследованиях, в настоящее время проводится ее стандартизация [8].

При интерпретации результатов ПЦР исследований, часто противоречивых, следует проявлять определенную осторожность, поскольку многие из этих исследований проводились с использованием разных ПЦР-анализов, дающих более высокий или более низкий предел обнаружения. Официального стандарта для калибровки количественных тестов пока не существует, а до недавнего времени не было и оценки качества коммерческих тест-систем. В результате чаще всего исследователи вынуждены разрабатывать собственные тесты для обнаружения и количественного определения вируса, обладающие разной чувствительностью. Ввиду огромного генотипического разнообразия ТТВ и разной чувствительности ПЦР-тестов, применяемых для выявления вируса, исследования, посвященные определению вирусной нагрузки, трудно сравнивать. Разработка надежного коммерческого ПЦР-теста для обнаружения ТТВ в будущем значительно упростит сравнение результатов исследований, посвященных изучению частоты циркуляции вируса, вирусной нагрузки у разных групп населения и его персистенции в разных органах и тканях пациентов. Важно учитывать и тот факт, что некоторыми исследователями показано, что у лиц, несущих больше геногрупп

TTV, вирусная нагрузка в целом выше. Несмотря на возможность того, что как высокоположительные, так и отрицательные TTV-нагрузки не всегда представляют собой иммунологический контроль, в многочисленных исследованиях показана тесная связь между высокой TTV-нагрузкой и риском инфицирования реципиента солидных органов, а также связь между низкой TTV-нагрузкой и риском отторжения аллографта. Определяемая высокая и низкая нагрузка TTV, оказалось, зависит от используемого метода, типа трансплантации органов и периода наблюдения. Однако почти все исследования по данной тематике проводились с использованием своего собственного теста, при этом показано, что корреляция между низким уровнем TTV и отторжением сильнее, чем корреляция между высоким уровнем TTV и риском инфицирования [3, 9, 10].

Цель исследования – создание компонентов для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени для обнаружения ДНК TTV в биологическом материале.

Материал и методы

Работа выполнялась на базе лаборатории молекулярно-генетических и биотехнологических исследований кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный медицинский университет».

Конструирование и подбор оптимальных праймеров и зондов с учетом размера (длины) ампликона, температуры отжига, нуклеотидного состава, распределения нуклеотидов по длине праймера, длины праймеров, возможности образования праймерами шпилек и димеров выполняли с помощью программ Primer-BLAST/Primer3, FastPCR. Поскольку праймеры, даже абсолютно уникальные для тех или иных последовательностей ДНК, могли отжигаться и на неспецифичных участках, не относящихся к анализируемому гену, нами выполнялась проверка соответствия праймеров последовательностям целевого гена. Для этого использовали online сервис NCBI Primer BLAST и оценивали локальное попарное выравнивание каждого из праймеров со всеми нуклеотидными последовательностями баз данных Refseq [11].

Были отобраны четыре группы праймеров-кандидатов (табл. 1).

Синтезированы несколько наборов праймеров, из которых в процессе подбора условий, температур и концентраций были выбраны оптимальные пары для использования и мультиплексирования между собой.

Следующие этапы работы: подбор оптимальной температуры отжига праймеров, концентраций праймеров, а также подбор оптимальной пары нуклеотидов из отобранных (рис. 1-5).

Таблица 1. – Праймеры для амплификации консервативных участков TTV

Table 1. – Primers for amplification of conserved regions of TTV

Последовательность
F: 5'- CAAGGGCAATTCGGGCTC-3' R: 5'- ACTNCGGTGTGAAACTCACCT-3'
F: 5'- GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3' R: 5'- AGCCCGGCCAGTCC-3'
F: 5'- GTGCCGRAGGTGAGTTTA-3' R: 5'- AGCCCGGCCAGTCC-3'
F: 5'- GTTTTCTACGCCCGTCC-3' R: 5'- CCTTGACTCCGGTGTGAA-3'

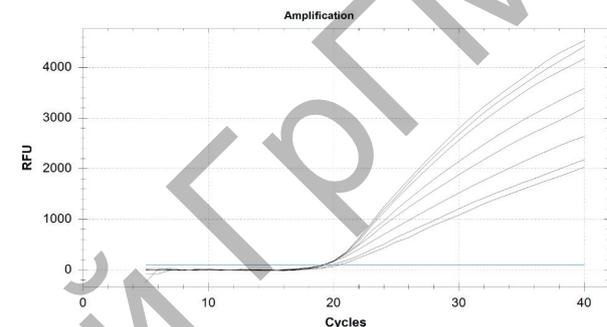


Рисунок 1. – Подбор и оптимизация температуры отжига праймеров
Figure 1. – Selection and optimization of primer annealing temperature

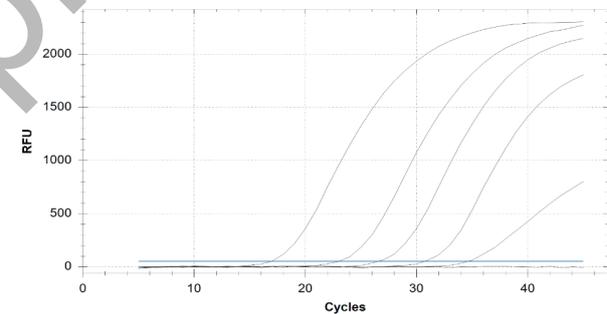


Рисунок 2. – Серийные разведения положительных образцов и оценка реакции
Figure 2. – Serial dilutions of positive samples and reaction assessment

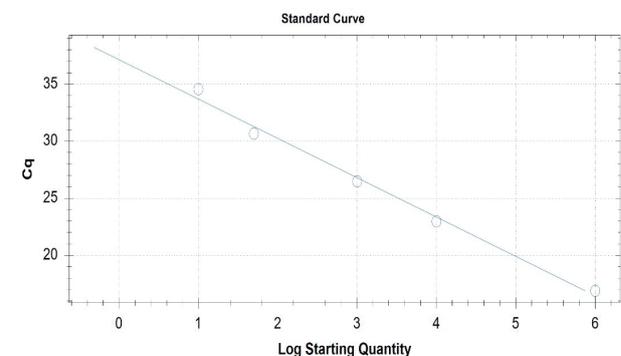


Рисунок 3. – Оценка диапазона, эффективности и чувствительности реакции
Figure 3. – Evaluation of response range, efficiency and sensitivity

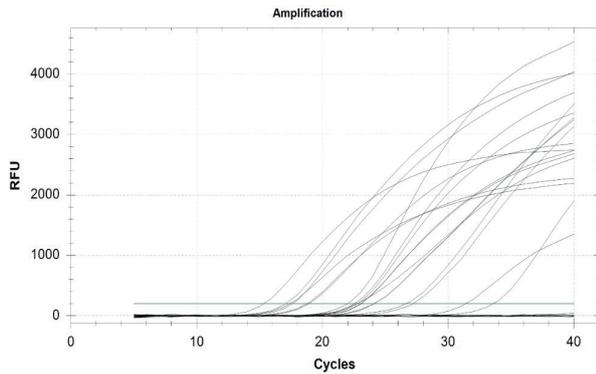


Рисунок 4. – Графики сигнала при амплификации клинических образцов
Figure 4. – Signal graphs during amplification of clinical samples

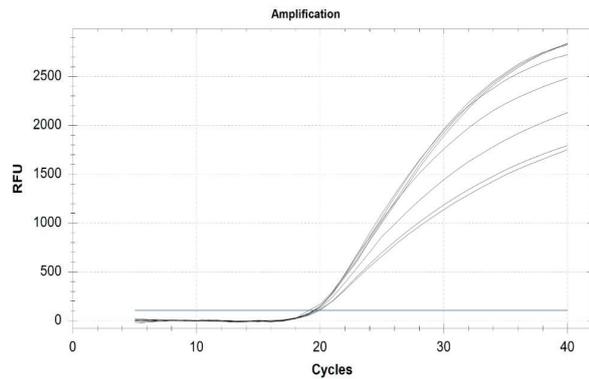


Рисунок 5. – Подбор и оптимизация концентрации праймеров
Figure 5. – Selection and optimization of primer concentrations

Для контроля протекания реакции амплификации и этапа выделения ДНК нами также использовались контрольные образцы положительного, внутреннего и отрицательного контроля.

Учитывая то, что задачей исследования было создание методики, позволяющей не только обнаруживать ДНК ТТV в биологическом образце, но и ее количественное измерение, в ходе разра-

ботки нами дополнительно проводились исследования по чувствительности, воспроизводимости результатов, а также вычислению предела обнаружения (ПО) (минимального количества) копий генетического материала в образце, которое может быть обнаружено, но необязательно точно количественно определено. В качестве положительных диагностикомов использовались плазмиды с количеством фрагмента ДНК 5 копий/мл, 50 копий/мл, 500 копий/мл, 5000 копий/мл, 50000 копий/мл, 500000 копий/мл.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований по подбору оптимальной температуры отжига праймеров, концентраций праймеров, а также подбору оптимальной пары нуклеотидов определены основные параметры сконструированных праймеров (табл. 2).

Специфичность выбранных олигонуклеотидов анализировали, применяя программу nucleotide Blast NCBI. Результаты реакции амплификации приведены в табл. 3 и на рис. 6.

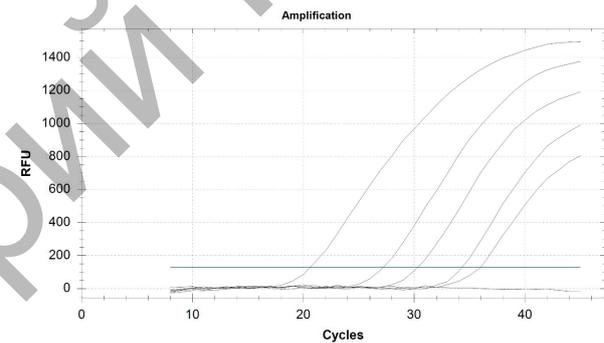


Рисунок 6. – Серийные разведения положительных образцов. Оценка диапазона, эффективности и чувствительности реакции
Figure 6. – Serial dilutions of positive samples. Evaluation of response range, efficiency, and sensitivity

Таблица 2. – Основные параметры сконструированных праймеров для детекции ТТV

Table 2. – Main parameters of designed primers for TTV detection

Прямой праймер			Обратный праймер			Флуоресцентный зонд		
Длина	Tm	GC%	Длина	Tm	GC%	Длина	Tm	GC%
18	61,6	55,6	14	61,9	78,6	19	65,9	57,9

Таблица 3. – Результаты реакции амплификации

Table 3. – Results of the amplification reaction

Образец	Копий/мл	Ct	Результат
1	500 000	20,62	положительный
2	50 000	27,21	положительный
3	5 000	30,31	положительный
4	500	34,31	положительный
5	50	36,01	положительный
6	5	-	отрицательный

Таблица 4. – Уровни ДНК (копий/мл) ТТV в плазме крови у здоровых лиц
Table 4. – TTV DNA (copies/ml) levels in blood plasma of healthy individuals

Показатель	Доноры (n=100)	Здоровые лица женского пола (n=43)	Здоровые лица мужского пола (n=57)
Частота выявления ДНК ТТV (абс/%)	83 (83%)	36 (83,7%)	47 (82,4%)
М	1377	1264	1463
ДИ 95%	757; 1997	349; 2179	823; 2103

Предел обнаружения ДНК ТТV в образце составляет не менее 50 копий/мл.

С целью оценки эффективности разработанного нами метода обнаружения ДНК ТТV был проведен анализ качественного и количественного определения ДНК ТТV у 100 здоровых лиц в возрасте от 18 до 60 лет. Среди включенных в исследование 58 были лицами мужского пола, женщины составили 42% из 100 обследованных. Как показал проведенный анализ, ДНК ТТV определялась у 83% здоровых лиц. Средний уровень вирусной нагрузки (М) составил 1568 копий/мл (ДИ 95%; 707...2429 копий/мл) (табл. 4). При этом не обнаружено отмеченных в некоторых литературных источниках [8, 12] достоверных различий в уровнях вирусной нагрузки у здоровых лиц в зависимости от пола ($p>0,05$), хотя вирусная нагрузка у мужчин была несколько выше.

Выводы

В результате проведенной работы созданы компоненты для выявления и количественного определения ДНК ТТV в биоматериале человека. По итогам оценки диагностической и аналитической чувствительности созданного набора установлено, что он обладает высокой специфичностью и чувствительностью, благодаря чему может быть применен для идентификации и определения количества ДНК ТТV при изучении роли вируса в патогенезе болезней человека, в определении его роли как маркера иммунодефицитных состояний.

Созданный набор для обнаружения и количественной оценки ДНК ТТV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени стал основой для разработки коммерческой тест-системы.

References

- Bisceglie AMD. TT virus and other anelloviruses [Internet]. *UpToDate*. 2023. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/tt-virus-and-other-anelloviruses/print>
- Family – Anelloviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ editors. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 331-341. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00033-1>.
- Gore EJ, Gard L, Niesters HGM, Van Leer Buter CC. Understanding torquetenovirus (TTV) as an immune marker. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1168400. doi: 10.3389/fmed.2023.1168400.
- Sarairah H, Bdour S, Gharaibeh W. The Molecular Epidemiology and Phylogeny of Torque Teno Virus (TTV) in Jordan. *Viruses*. 2020;12(2):165. doi: 10.3390/v12020165.
- Pachot A, Venet F, Monneret G, Lepape A, Rimmelé T, Tan LK, Brengel-Pesce K, Textoris J. Herpes DNAemia and TTV Viraemia in Intensive Care Unit Critically Ill Patients: A Single-Centre Prospective Longitudinal Study. *Front Immunol*. 2021;12:698808. doi: 10.3389/fimmu.2021.698808.
- Maev IV, Karlovich TI, Burmistrov AI, Chekmazov IA, Andreev DN, Reshetnyak VI. Sovremennye predstavleniya o roli Torque Teno Virus (TTV) pri zabolevaniyah pecheni [Current Views of Torque Teno Virus (TTV) in Liver Diseases]. *Rossiiskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii* [Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology]. 2020;30(4):7-22. doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-7-22. edn: OVAWZN. (Russian).
- Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(7):589-93. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.007.
- Reshetnyak VI, Maev IV, Burmistrov AI, Chekmazov IA, Karlovich TI. Torque teno virus in liver diseases: On the way towards unity of view. *World J Gastroenterol*. 2020;26(15):1691-1707. doi: 10.3748/wjg.v26.i15.1691.
- Kulifaj D, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, Joannes M, Essig M, Hantz S, Barranger C, Alain S. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. 2018;105:118-127. doi: 10.1016/j.jcv.2018.06.010.
- Maggi F, Focosi D, Statzu M, Bianco G, Costa C, Macera L, Spezia PG, Medici C, Albert E, Navarro D, Scagnolari C, Pistello M, Cavallo R, Antonelli G. Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep*. 2018;8(1):15490. doi: 10.1038/s41598-018-33909-7.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis*. 2014;210(4):667-8. doi: 10.1093/infdis/jiu209.

Вклад авторов. Семенов В. М., Егоров С. К., Лятос И. А., Дмитраченко Т. И., Косова М. С., Зенькова С. К.: концепция и дизайн исследования, разработка компонентов для тест-системы, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, редактирование, обсуждение данных; Марченко А. А., Савочкина К. А.: обзор публикаций по теме, сбор материала для клинического испытания тест-системы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках ГПНИ «Трансляционная медицина», госрегистрация № 20220336.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Семенов Валерий Михайлович, д-р мед. наук, проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: vmsemenov@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7029-9226

Егоров Сергей Константинович, канд. мед. наук, доц., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: delta505@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-7352-9368

Лятос Игорь Александрович, канд. мед. наук, доц., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: ialjatos@gmail.com, ORCID: 0009-0008-9011-2028

Дмитраченко Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: tid74@rambler.ru, ORCID: 0000-0002-5537-3459

Марченко Арина Анатольевна, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: arina.oladko@gmail.com, ORCID: 0009-0006-6871-6808

Косова Марина Сергеевна, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: marishe4ka2558@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6180-6700

Зенькова Светлана Константиновна, канд. мед. наук, доц., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: svecon@inbox.ru, ORCID: 0000-0002-7446-2684

Савочкина Ксения Алексеевна, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, e-mail: h635@bk.ru, ORCID: 0009-0008-7080-2849

Author contributions. V. Semenov, S. Yahorau, I. Lyatos, T. Dmitrachenko, M. Kosova, S. Zenkova: concept and design of the study, development of components for the test system, obtaining experimental data, statistical data processing, editing, discussion of data; A. Marchenko, K. Savochkina, A. Kashtanov: review of publications on the topic, collection of material for clinical testing of the test system.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out within the framework of the State Research Institute "Translational Medicine", state registration No. 20220336.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about authors:

Semenov Valery M., PhD, MD (Medicine), Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: vmsemenov@mail.ru, ORCID: 0000-0002-7029-9226

Yahorau Sergey K., PhD (Medicine), Associate Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: delta505@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-7352-9368

Lyatos Igor A., PhD (Medicine), Associate Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: ialjatos@gmail.com, ORCID: 0009-0008-9011-2028

Dmitrachenko Tatiana I., PhD, MD (Medicine), Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: tid74@rambler.ru, ORCID: 0000-0002-5537-3459

Marchenko Arina A., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: arina.oladko@gmail.com, ORCID: 0009-0006-6871-6808

Kosova Marina S., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: marishe4ka2558@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6180-6700

Zenkova Svetlana K., PhD (Medicine), Associate Professor, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: svecon@inbox.ru, ORCID: 0000-0002-7446-2684

Savochkina Ksenia A., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, e-mail: h635@bk.ru, ORCID: 0009-0008-7080-2849

Поступила: 14.04.2024

Принята к печати: 23.04.2024

Received: 14.04.2024

Accepted: 23.04.2024